

# DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

**im Fach Biologie**

## **Identifizierung neuer inhibitorischer Substanzen gegen das humane Cytomegalievirus**

**eingereicht an der**

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

**der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

**Jae-Seon Hwang**

Diplom-Biologe

aus Seoul Südkorea

geboren am 14. Dezember 1968

**Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin**

**Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches**

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

**Prof. Dr. rer. nat. Lutz-Helmut Schön**

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Detlev H. Krüger

2. PD. Dr. rer. nat. Elke Bogner

3. PD. Dr. rer. nat. Thorsten Wolff

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2009

---

## **Inhaltsverzeichnis**

1.	Einleitung	1
1.1	Taxonomie	1
1.2	Medizinische Aspekte	2
1.2.1	Epidemiologie und klinische Manifestation	2
1.2.2	Therapeutische Ansätze	4
1.3	Biologische Aspekte	4
1.3.1	Aufbau der Virionen	4
1.3.2	Genomstruktur	6
1.4	Replikationszyklus des HCMV	7
1.4.1	Virale Adsorption	7
1.4.2	Virale Genexpression	7
1.4.3	Morphogenese der Viruspartikel	8
1.5	HCMV DNA-Verpackung	10
1.6	Wirkung von Benzimidazol D-Ribonukleoside	11
2.	Problemstellung	14
3.	Materialien	15
3.1	Bezugsquellen	15
3.2	Chemikalien	15
3.3	Grundstoffe für Kulturmedien	16
3.4	Antibiotika	16
3.5	Enzyme	16
3.6	Kits	16
3.7	Antikörper	17
3.7.1	Monoklonale Antikörper	17
3.7.2	Sekundäre Antikörper	17
3.8	Sonstige Materialien	18
3.9	Geräte	18
3.10	Zellkulturmedien	19
3.11	Puffer	19

3.12 Zellkulturen	21
3.13 Virusstämme	22
3.13.1 HCMV AD169	22
3.13.2 GCV-sensitives klinisches HCMV Isolat	22
3.13.3 GCV-resistentes klinisches HCMV Isolat	22
3.13.4 Maus-Cytomegalovirus (MCMV)	22
3.13.5 Ratten-Cytomegalovirus (RCMV)	22
3.13.6 Herpes-simplex-Virus Typ-1 (HSV-1)	22
3.13.7 Varicella-Zoster-Virus (VZV)	23
3.14 Benzimidazol D-Ribonukleoside	23
4. Methoden	24
4.1 Zellbiologische Methoden	24
4.1.1 Kultivierung humaner Vorhautfibroblasten (HFF) und Fi. 301-Zellen	24
4.1.2 Kultivierung von embryonalen Ratten Fibroblasten (Rat2 Zellen)	24
4.1.3 Kultivierung von Murinen Fibroblasten (NIH-3T3 Zellen)	24
4.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
4.1.5 Anzucht einer Virus-Stammsuspension (HCMV AD169)	25
4.1.6 Titration einer Virus-Stammsuspension	26
4.1.7 Experimentelle Virusinfektion	26
4.1.8 Anzucht eines GCV-sensitiven klinischen HCMV- Isolats	26
4.1.9 Anzucht eines GCV-resistenten klinischen HCMV- Isolats	27
4.1.10 Plaque Reduktions Test	27
4.1.11 Wachstumskurve	28
4.1.12 Stabilitätsanalyse <i>in vivo</i>	28
4.1.13 Bestimmung der Abhängigkeit von der Zeit der Zugabe	28
4.1.14 Zytotoxizitäts Test (MTS-Test)	29

---

4.2	Proteinbiochemische Methoden	30
4.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
4.2.2	Coomassie-Färbung	31
4.2.3	Autoradiographie	32
4.3	Molekularbiologische Methode	32
4.3.1	Pulsfeld-Gelelektrophorese	32
4.3.2	DNA-Bindungsexperimente	33
4.3.2.1	<i>In vitro</i> -Translation von Proteinen	33
4.3.2.2	<i>In vitro</i> -DNA-Bindungsexperimente	33
4.4	Immunologische Methoden	34
4.4.1	Immunfluoreszenz	34
4.5	Elektronenmikroskopie	35
4.5.1	Fixierung und Einbettung von Zellen für die Elektronenmikroskopie	35
5.	Ergebnisse	37
5.1	Analyse neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside	37
5.1.1	Antivirale Aktivität der Substanzen	37
5.1.2	Zytotoxizität der Substanzen	38
5.1.3	Stabilität der Substanzen	41
5.2	Wirkung neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside auf die HCMV DNA-Replikation	42
5.2.1	Einfluss der Inhibitoren auf die Freisetzung von Virionen	43
5.2.2	Wirkung der Inhibitoren auf den viralen Replikationszyklus	44
5.2.3	Einfluss von Benzimidazol D-Ribonukleosiden auf die pUL56 assoziierte DNA-Bindung	45
5.2.4	Einfluss der Benzimidazol D-Ribonukleosid-Behandlung auf die DNA-Prozessierung	48
5.2.5	Einfluss auf die Expression von viralen Proteinen	50
5.2.6	Einfluss auf die DNA-Verpackung und die Bildung infektiöser Partikel	52

5.3	Wirkung der Benzimidazol D-Ribonukleoside auf klinische HCMV-Isolate	54
5.3.1	Antivirale Aktivität der Substanzen auf klinische HCMV-Isolate	55
5.3.2	Einfluss der Inhibitoren auf die Freisetzung von Virionen	57
5.3.3	Einfluss auf die Spaltung konkatemerer DNA in mit HCMV Isolaten infizierten Zellen	59
5.3.4	Einfluss auf die DNA-Verpackung und die Bildung infektiöser Partikel	60
5.4	Wirkung neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside auf andere Herpesviren	65
6.	Diskussion	67
6.1	Analyse neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside	68
6.2	Wirkung neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside auf die HCMV DNA-Replikation	69
6.3	Wirkung neuer Benzimidazole D-Ribonukleoside auf klinische HCMV-Isolate	72
6.4	Wirkung neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside auf anderen Herpesviren	73
7.	Zusammenfassung	75
8.	Literaturverzeichnis	77
9.	Anhang	87
	Abkürzungsverzeichnis	87
	Veröffentlichungen	89
	Erklärung	91
	Danksagung	92

# 1. Einleitung

## 1.1 Taxonomie

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) gehört nach der Klassifikation des “Internationalen Komitees für Virustaxonomie“ (ICTV; Roizman et al., 1992) zur Familie der **Herpesviridae**. Bis dato sind annähernd 100 Spezies bekannt, wovon acht humanpathogen sind (Tab. 1).

Zu den strukturellen Gemeinsamkeiten der Herpesviren zählen der Aufbau der Viruspartikel, die ikosaedrische Kapsidsymmetrie sowie der Besitz eines doppelsträngigen, linearen DNA-Genoms und einer Virushülle. Weitere charakteristische Merkmale der Herpesviren sind der Besitz einer eigenen DNA-Polymerase für die virale Replikation und die Fähigkeit, im Wirtsorganismus in latentem Zustand lebenslang zu persistieren. Die Vertreter der Herpesviren lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen biologischen Eigenschaften, die sich auf das Wirtsspektrum, die Dauer des Replikationszyklus sowie Zytopathologie und Zelltropismus beziehen, in drei Unterfamilien,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -**Herpesviridae**, unterteilen (Roizman et al., 1992; Tab. 1).

**Tab. 1.1: Taxonomische Einordnung der Vertreter humanpathogener Herpesviren.**

Unterfamilie	Gattung	Art	Kurzbezeichnung
$\alpha$ -Herpesvirinae	Simplexvirus	Herpes Simplex Virus 1 Herpes Simples Virus 2	(HSV-1, HHV 1) (HSV-2, HHV 2)
	Varicellovirus	Varicella-Zoster-Virus	(VZV, HHV 3)
$\beta$ -Herpesvirinae	Cytomegalievirus	Humanes Cytomegalieviurs	(HCMV, HHV 5)
	Roseolovirus	Humanes Herpesvirus 6 Humanes Herpesvirus 7	(HHV 6) (HHV 7)
$\gamma$ -Herpesvirinae	Lymphocryptovirus Rhadinovirus	Epstein-Barr-Virus Humanes Herpesviurs 8	(EBV, HHV 4) (HHV 8)

Nach Chang et al., 1994; Roizman et al., 1992; Frenkel et al., 1990; Josephs et al., 1986 ; Schneeweis et al., 1962 ; Smith, 1956

Die  **$\alpha$ -Herpesvirinae**, zu denen das Herpes Simplex Virus (HSV Typ 1 und 2) und das Varizella-Zoster Virus (VZV) zählen, zeichnen sich aus durch ein breites Wirtsspektrum, einen relativ kurzen Replikationszyklus, die schnelle Ausbreitung in Zellkultur, einen zytolytischen Effekt in infizierten Wirtszellen und die Fähigkeit, in sensorischen Ganglien latent zu persistieren.

Die Vertreter der Subfamilie der  **$\beta$ -Herpesvirinae**, zu denen auch das humane Cytomegalievirus (HCMV) gehört, zeichnen sich durch ein sehr enges Wirtsspektrum, einen langen Replikationszyklus und eine langsame Zell-zu-Zell Ausbreitung aus. Mit HCMV infizierte Wirtszellen zeigen durch starke Vergrößerung (Cytomegalie) einen deutlichen zytopathischen Effekt (CPE), der namensgebend für das Virus war. In Zellen des lymphoretikulären Gewebes, sekretorischen Drüsen und der Niere können die Viren in ihrer latenten Phase persistieren.

Die  **$\gamma$ -Herpesvirinae**, deren einzige humanpathogene Vertreter das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Humane Herpesvirus Typ 8 (HHV 8), das das Karposisarkom hervorruft, sind, weisen neben einem engen Wirtsspektrum einen spezifischen Tropismus für B- bzw. T-Lymphozyten auf.

## 1.2 Medizinische Aspekte

### 1.2.1 Epidemiologie und klinische Manifestation

Herpesvirusinfektionen erfolgen im Menschen sowie auch in vielen Wirbeltierarten; z.B. Affen, Katzen bis hin zu Fröschen und Fischen. Einziges Virusreservoir für HCMV ist der infizierte Mensch, der Virus in Körpersekreten ausscheidet. Das HCMV kann besonders bei kongenital infizierten Neugeborenen und bei immundefizienten Erwachsenen schwere generalisierte Infektionen hervorrufen. Beträgt die Durchseuchungsrate in Industrieländern 50 bis 60 % der erwachsenen Bevölkerung, so können in Entwicklungsländern bis zu 100 % erreicht werden (Pass, 2001). Die Übertragung erfolgt durch engen Kontakt mit einem Virusausscheider; z.B. über Tröpfcheninfektion, über die Muttermilch bei Säuglingen (Hamprecht et al., 2000) oder durch Sexualverkehr. Während bei immunkompetenten Personen eine Primärinfektion in der Regel inapparent verläuft, erhöht sich das Risiko einer Erkrankung bei therapeutischer (Transplantationen) und physiologischer Immunsuppression (Schwangerschaft). Von großer medizinischer Bedeutung ist die HCMV-



Infektion bei Neugeborenen. Die schweren Schädigungen, wie beispielsweise Wachstumsstörungen, Hepatosplenomegalie, Gelbsucht, Microencephalie und Chorioretinitis, erfolgen durch eine Primärinfektion der Mutter, bei der intrauterin das Virus auf das Neugeborenen übertragen wird. Weltweit sind insgesamt 1–3 % aller Neugeborenen infiziert. Es handelt sich hauptsächlich um Schädigungen des zentralen Nervensystems, die sich beispielsweise in Hördefekten oder geistigen und körperlichen Entwicklungsrückständen äußern. Weiterhin haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass ein großer Prozentsatz von Kindern, die kurz nach der Geburt unauffällig waren, in der weiteren Entwicklung Schädigungen aufweisen können. Neben dem Down-Syndrom stellt die kongenitale HCMV-Infektion die zweithäufigste Ursache bleibender zentralnervöser Schädigungen dar (Hamprecht & Jahn, 1994).

Nach der Primärinfektion kommt es zur lebenslangen Persistenz des Virus im Organismus, bei der mitunter symptomlose Reaktivierungen vorkommen können. In seltenen Fällen treten Symptome wie Fieber, Muskelschmerzen und ein Mononucleose-ähnliches Krankheitsbild auf. Bei immunsupprimierten bzw. immundefizienten Personen hingegen kann die Primärinfektion oder die Reaktivierung der Viren mit schweren Krankheitssymptomen verbunden sein. Bei Nierentransplantationen entwickelt mindestens die Hälfte aller Empfänger durch HCMV-positive Spenderorgane eine oft lebensbedrohliche Infektionskrankheit (Toupance et al., 2000). Noch höher liegt die Morbidität und Mortalität nach Knochenmarkstransplantationen. Bei den schwerwiegenden Erkrankungen handelt es sich um die HCMV-bedingte interstitielle Pneumonie und Hepatitis (Cheung und Teich, 1999).

Auffällig ist, dass vor allem Retinitis und die Schädigungen des ZNS sehr häufig (85%) bei Patienten, die mit HIV infiziert sind, beobachtet werden. Vermutlich beschleunigt das HCMV als einer der häufigsten opportunistischen Erreger die Vermehrung von HIV und verkürzt damit die Inkubationszeit bis zum Auftreten des vollständigen Krankheitsbildes AIDS (Griffiths, 1992 und 1999).

### 1.2.2 Therapeutische Ansätze

Zum jetzigen Zeitpunkt steht keine wirksame Immunprophylaxe gegen die HCMV-Infektion zur Verfügung. Im Fall einer vorliegenden Infektion werden die Nukleosidanaloga Ganciclovir, Aciclovir und Valaciclovir, sowie das Nukleotid analog Cidofovir und schließlich das Pyrophosphat analog Foscarnet zur Therapie verwendet. Sie haben einen inhibitorischen Effekt auf die virale DNA-Synthese (DeClercq et al., 1993) und werden vor allem bei der Behandlung akuter HCMV-Infektionen immunsupprimierter Patienten verwendet. Ganciclovir wird interessanterweise erst nach Phosphorylierung durch die virale Kinase pUL97 aktiviert (Sullivan et al., 1992). Nachteil dieser Chemotherapeutika sind zum einen Nebenwirkungen, die durch die Nephrotoxizität oder niedrige Bioverfügbarkeit ausgelöst werden (Curran and Noble, 2001; Deray et al., 1989). Zum anderen kommt es zur Gefahr der Selektion resistenter Virusmutanten (Lurain et al., 1994; Erice, 1999). Es konnten bereits resistente HCMV-Stämme isoliert werden, die Punktmutationen in den Genen des pUL97 sowie der viralen DNA-Polymerase besaßen (Lurain et al., 1992; Lurain et al., 1994; Michel et al., 1998).

Die HCMV Laborstämme Towne und AD169 wurden bereits als attenuierte Lebendimpfstoffe verwendet, erfolgte jedoch keine Induzierung des effizienten Schutz gegen Wildtyp-Stämme. Strategien zur Impfstoffherstellung haben zum Inhalt die Entwicklung von modularen Impfstoffen mit definierten molekularen immunogenen Bausteinen, Pockenvirus- und Plasmid-DNA-Vektoren mit inserierten HCMV-Genen und Peptid-Vakzine (Schleiss and Heinemann, 2005).

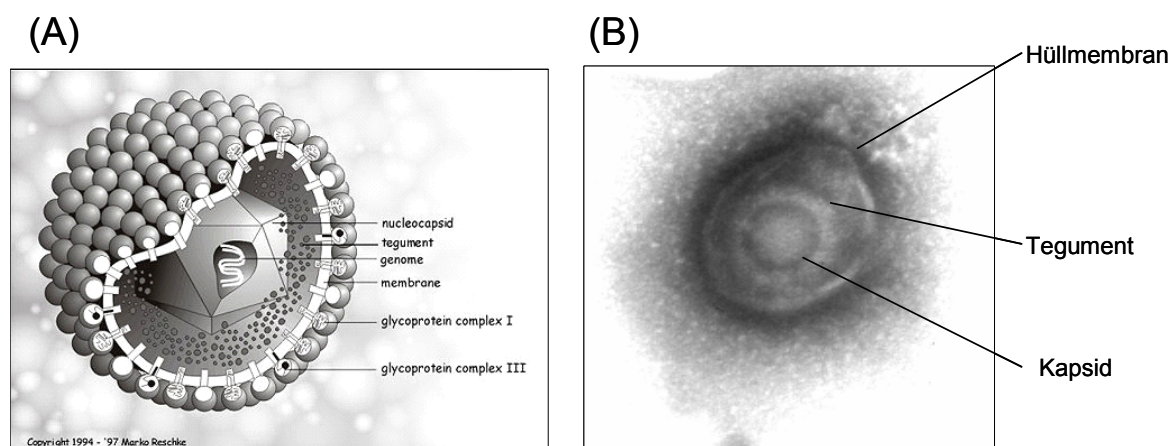
Zum weiteren Therapieansatz steht die Verabreichung von Immunglobulinpräparaten, die aus hochtitrigem Rekonvaleszentenserum gewonnen werden (z.B. Polyglobin<sup>®</sup> N), zur Verfügung.

## 1.3 Biologische Aspekte

### 1.3.1 Aufbau der Virionen

Die Struktur der HCMV-Virionen ist charakteristisch für alle Herpesviren. Das Virion hat einen Durchmesser von ca. 150-200 nm. Es besitzt in seinem Inneren einen ca. 64 nm großen Viruskern (Core), der sich aus dem doppelsträngigen DNA-Genom

und einer fibrillären Proteinmatrix zusammensetzt (Wright *et al.*, 1964). Umgeben wird der Viruskern (Core) von einem ikosaedrischen angeordneten Kapsid, welches aus 162 Kapsomeren besteht und mit dem Viruskern als Nukleokapsid von 110 nm Durchmesser bezeichnet wird. Das Nukleokapsid ist wiederum in eine amorphe, ausschließlich aus Phosphoproteinen aufgebaut und als Tegument bezeichnet Matrix eingebettet (Britt & Auger, 1985). Auf der Hüllmembran stehen mehrere eingelagerte virale Glykoproteine, die im Komplex assoziiert sind. Diese Komplexe spielen eine Rolle für die Adsorption des Virus und die Fusion zwischen Virus- und Plasmamembran. Im Verlauf der Reifung wird das Partikel von Membranen des tubulären Endosoms mit einer Lipid-Doppelmembran umhüllt (Tooze *et al.*, 1993), die durch Einlagerung viraler Proteine modifiziert ist (Radsak *et al.*, 1996).



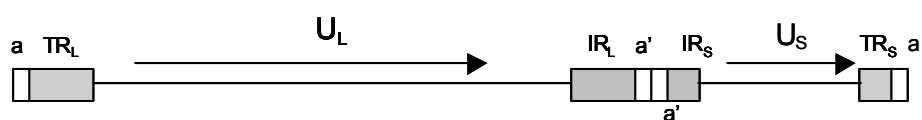
**Abb. 1.1: Das HCMV-Virion.**

A) Schematische Darstellung eines HCMV-Partikels. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines extrazellulären Virions nach Negativkontrastierung (Bogner, 2002).

Nicht-infektiöse Viruspartikel werden neben den infektiösen Virionen in der Zelle gebildet. Die sog. „dense bodies“ bestehen nur aus Membran und Tegument (Sarav & Abady, 1975). Eine weitere Form nicht-infektiöser Viruspartikel stellen „non-infectious enveloped particles“ (NIEP's) dar, die zwar ein Kapsid, aber keine DNA enthalten (Irmieri & Gibson, 1983; Gibson, 1996b).

### 1.3.2 Genomstruktur

HCMV besitzt das größte Genom (Bankier et al., 1991), das aus einer linearen doppelsträngigen DNA mit einem Molekulargewicht von  $1,5 \times 10^8$  Da und einer Länge von 229 kb besteht (Chee et al., 1990; Bankier et al., 1991). Die Sequenz von dem Laborstamm AD169 wurde bereits vollständig aufgeklärt (Chee et al., 1990; Murphy et al., 2008). Charakteristisch kommt zwei unterschiedlich lange nicht-repetitive Segmente ( $U_L = \text{unique long}$ ,  $U_S = \text{unique short}$ ) vor, die jeweils von zwei invertierten repetitiven Sequenzabschnitten flankiert werden ( $TR_L$ ,  $TR_S = \text{terminal repeat long bzw. short}$ ;  $IR_L$ ,  $IR_S = \text{internal repeat long bzw. short}$ ). Die a-Sequenzen liegen in den Genomtermini sowie in der Übergangsregion zwischen dem  $U_L$ - und  $U_S$ -Segment. Sie tragen die für die virale Replikation notwendigen Spaltungs-/Verpackungssignale *pac1* und *pac2* (McVoy et al., 1998). Sie sind invertiert und können in bis zu 10 Kopien im Genom vorliegen (Mocarski et al., 1987). Aufgrund dieser Segmentkonstellation ist das Vorkommen der nicht-repetitiven Sequenzabschnitte jeweils in zwei Orientierungen charakteristisch. Der zugrundeliegende Rekombinationsprozeß führt zur Entstehung von vier isomeren Genomformen, die in einer Viruspopulation in äquimolarer Menge gebildet werden (Stinski et al., 1981; Dutch et al., 1992).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines HCMV-Genoms.**

Das Genom des HCMV besteht aus zwei nicht repetitiven Segmenten,  $U_L$  (unique long) und  $U_S$  (unique short), die an den Enden von repetitiven Sequenzen,  $TR$  (terminal repeats) und  $IR$  (internal repeats) flankiert werden.

## 1.4 Replikationszyklus des HCMV

### 1.4.1 Virale Adsorption

Das HCMV ist strikt Speziesabhängig und durchläuft einen längeren Infektionszyklus (72 h) im Vergleich zu anderen Vertretern dieser Familie. Die Adsorption des Virus an die Oberfläche der Wirtszelle ist der initiale Schritt der Virusreplikation, wobei vor allem die viralen Glykoproteine gB (gpUL55) und gH (gpUL75) beteiligt sind (Navarro et al., 1993; Bold et al., 1996; Keay et al., 1989). Die Identität des hierbei notwendigen zellulären Rezeptors ist noch nicht bekannt. Es wird jedoch angenommen, daß gB den Kontakt zur Wirtszelle über unspezifische Bindungen an Heparansulfat-Proteoglykane vermittelt (Compton et al., 1993). Als spezifischer Rezeptor wurde das zelluläre Annexin II diskutiert, inzwischen jedoch wieder als unwahrscheinlich erachtet (Compton, 1995; Pietropaolo & Compton, 1999). Durch die zelluläre Aminopeptidase CD13 wird möglicherweise eine spezifische Bindung des gH an die Zelloberfläche vermittelt (Söderberg et al., 1993). Die Adsorption wird zusätzlich über das zelluläre  $\beta_2$ -Microglobulin unterstützt (Grundy et al., 1987). Im Anschluß an die Adsorption läuft die Penetration des Virus durch pH-unabhängige Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle in das Zytoplasma (Compton et al., 1992). Die Glykoproteine B und H spielen eine Rolle für den Fusionsprozeß (Reschke et al., 1995; Bold et al., 1996; Keay & Baldwin, 1992). Analog zum Herpes Simplex Virus 1 wird das Nukleokapsid im Zytoplasma höchstwahrscheinlich entlang eines Dynein-vermittelten retrograden Transports an Mikrotubuli entlang zu den Kernporen gebracht (Sodeik et al., 1997; Diefenbach et al., 2002; Dohner et al., 2002). An der Kernspore wird die virale DNA in das Karyoplasma entlassen, wo es zirkularisiert (Ojala et al., 2000).

### 1.4.2 Virale Genexpression

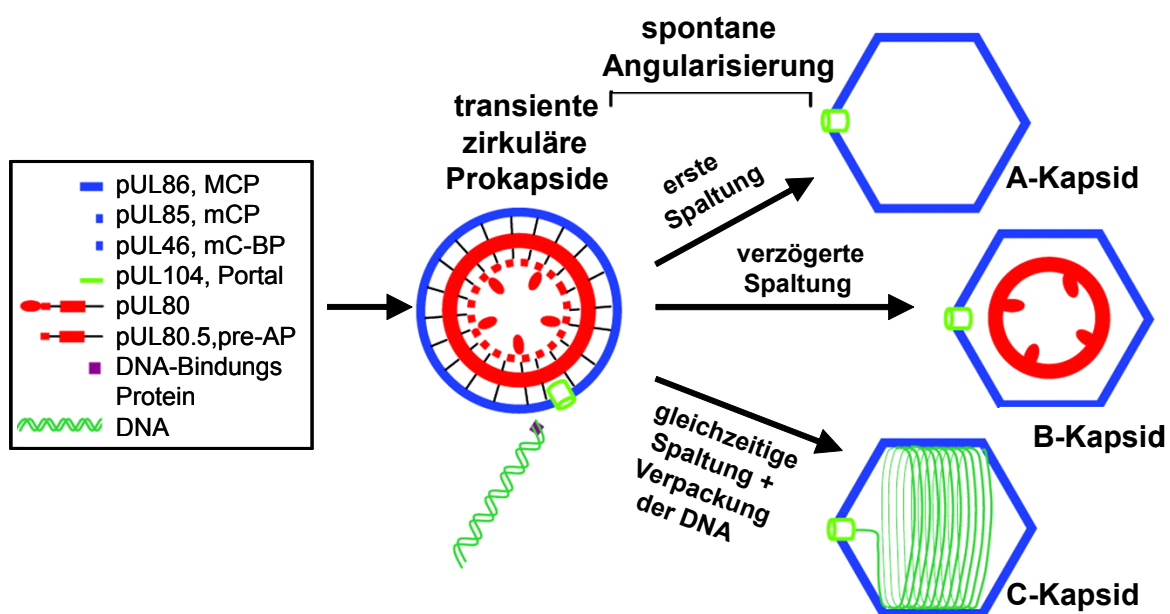
Im Anschluß an den Transport des viralen Genoms in den Zellkern erfolgt die Expression des viralen Genoms kaskadenartig unter Mitwirkung zellulärer Transkriptionsfaktoren (Wathen & Stinski, 1982). In der sehr frühen Transkriptionsphase (*immediate early*, IE; 0 – 3 hp.i.) wird die Transkription der IE-Gene unmittelbar nach der Infektion eingeleitet und ist unabhängig von einer de

*novo*-Synthese viraler Proteine. Vor allem werden Transkripte für regulatorische Genprodukte ( $\alpha$ -Proteine) synthetisiert. Die Transkription vieler  $\alpha$ -Proteine wird durch den *major immediate early promotor* (MIEP) in der sehr frühen Transkriptionsphase gesteuert (Boshart et al., 1985). Aufgrund ihrer transaktivierenden Eigenschaften leiten die  $\alpha$ -Proteine die Expression der frühen und späten Gene ein. Die Transkription der frühen Gene ( $\beta$ -Gene) beginnt zwischen 4 und 24 h p.i. und die der späten Gene ( $\gamma$ -Gene) kommt später nach 24 h post Infektion vor. Die späte (*late*) Phase der Expressionskaskade setzt mit dem Beginn der viralen DNA-Replikation ein, wobei nun vor allem Strukturproteine ( $\gamma$ -Genprodukte) exprimiert werden. Die Replikation des viralen Genoms erfolgt höchstwahrscheinlich nach dem „rolling circle“-Mechanismus (Stinski et al., 1983; Anders et al., 1992). Kurz nach der Infektion konnten zirkuläre HCMV-Genome in der Zelle detektiert werden (LaFemina et al., 1983). Daher werden neu synthetisierte Genome als lineare Konkatomere von einer zirkulären Matrize aus gebildet, gespalten und anschließend in Form von Genomeinheiten in das Kapsid verpackt (McVoy & Adler, 1994). Die Expression der späten Gene setzt mit dem Beginn der DNA-Synthese ein, wobei es zur hauptsächlichlichen Synthese der strukturellen Kapsid-, Tegument- und Membranproteine kommt.

### 1.4.3 Morphogenese der Viruspartikel

Die neu synthetisierten viralen Genome im Zellkern werden in noch unreife Nukleokapside (Prokapside, B-Kapside) eingeschleust (Roizman, 1993). Als Bestandteile der  $\alpha$ -Sequenzen spielt hierbei die *cis*-aktiven Verpackungssequenzen *pac* 1 und 2 eine Rolle, die als Signale zur der Spaltung und Verpackung der viralen DNA verwendet werden (Mocarski et al., 1987; Kemble & Mocarski, 1989). Zu dem Reifungsprozeß herpesviraler Kapside, die in unmittelbarer Nähe von intranukleären, lichtmikroskopisch erkennbaren Einschlußkörpern gebildet werden (Haguenau & Michelson, 1975), erfolgt momentan folgende Vorstellung : Aus Untersuchungen am Equinen Herpesvirus und Herpes Simplex Virus ist bekannt, daß in der Zelle drei unterschiedlich zusammengesetzte Kapsid-Formen entstehen. Diese sind anhand ihrer Zusammensetzung unterschiedlich und werden als A-, B- bzw. C-Kapside bezeichnet (Gibson, 1996c; Rixon, 1993). Die extrem kurzlebigen Vorläuferkapside (prä-B-Kapside, Newcomb et al., 1996) stellen die Ausgangsform der A- und C-

Kapside dar. Die Reifung zu DNA-haltigen C-Kapsiden findet während des Einschleusens der viralen Genomeinheiten statt. A-Kapside können bei abortiver DNA-Verpackung entstehen und enthalten somit keine DNA (Perdue et al., 1976). Die B-Kapside besitzen das *assembly protein precursor* Protein (*scaffolding protein*, Gibson, 1983), das als Gerüst für die Anordnung der Strukturkomponenten Hauptkapsidprotein (MCP), kleine Kapsidprotein (mCP) und kleinste Kapsidprotein (SCP) im Kapsid verantwortlich ist (Gibson, 1996). Das *assembly protein precursor* protein wird im Verlauf der DNA-Verpackung während der Reifung zu den C-Kapsid jedoch entfernt (Rixon et al., 1988). Die Spaltung und Verpackung der viralen Genome sowie die Umorganisation von B- zu C-Kapsiden ist höchstwahrscheinlich ein synchron ablaufender Prozeß, der innerhalb der *Herpesviridae* hoch konserviert ist (Ladin et al., 1980; Trus et al., 1999).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des HCMV Kapsid-Assembly und Reifung (Yu, 2005)**

Im weiteren Verlauf interagieren die reifen Nukleokapside mit einer Reihe von Tegumentproteinen pp150, pp71 und pp65. Dieser Prozess ist bislang unvollständig bekannt. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass einige Tegumentproteine in infizierten Zellen mit dem nukleären Protein-Netzwerk, der Matrix, assoziiert sind.

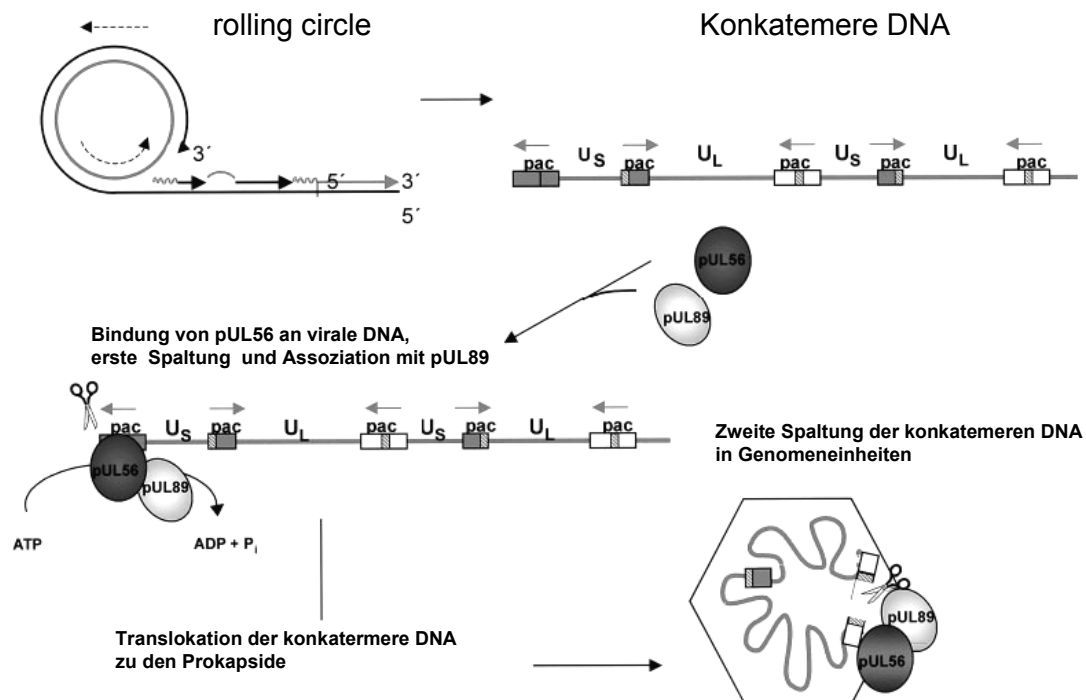
Daher erfolgen sowohl die Kapsidreifung als auch die Tegument-Bildung teilweise im Kern. Die Protein-Protein Interaktion mit der nukleären Matrix sorgt hierbei möglicherweise für eine räumliche Koordination der komplexen Vorgänge (Sanchez et al., 1998). Die umhüllten Nukleokapside gelangen durch als Transportknospung bezeichneten Prozeß in das Zytoplasma (Radsak et al., 1989). Während dieser Transportknospung erhalten die Kapside eine temporäre Membranhülle, die von der inneren Kernmembran stammt und nach Fusion mit der äußeren Kernmembran verloren geht. Dabei scheint unter anderem das Glykoprotein gB, das auf spezifischem Wege in die innere Kernmembran transportiert wird (Meyer & Radsak, 2000), aber auch gH beteiligt zu sein (Radsak et al., 1990; Bogner et al., 1992), da im Zytoplasma einige Tegumentproteine spät nach Infektion detektiert wurden (Battista et al., 1999; Landini et al., 1987). Dementsprechend geht man davon aus, dass die Kapside im Zytoplasma mit Tegumentproteinen umgeben werden (Sanchez et al., 2000). Anschließend findet die endgültige Umhüllung der Kapside an Zisternen des tubulären Endosoms (Tooze et al., 1993) statt. Die Membranen dieser Zisternen sind durch den Einbau viraler Glykoproteine modifiziert (Radsak et al., 1996). Die reifen Viruspartikel werden schließlich über zelluläre Exozytose aus der Wirtszelle ausgeschleust.

## 1.5 HCMV DNA-Verpackung

Die Verpackung und Spaltung konkatemerer DNA ist ein essentieller Prozeß bei der Reifung von Virionen. Dieser Vorgang ist innerhalb der Herpesviren konserviert und wurde erstmals bei DNA Bakteriophagen beschrieben. Die doppelsträngigen DNA Bakteriophagen, den Caudovirales, zeigen Ähnlichkeiten zu den Herpesviren im Kapsidaufbau. Die HCMV Terminase setzt sich zusammen aus den Terminaseuntereinheiten pUL56 und pUL89. Aufgrund der Fähigkeit DNA mit Verpackungssignalen *in vitro* zu spalten (Bogner et al., 1998; Scheffczyk et al., 2002) und wegen der Homologie zu entsprechenden Proteinen von DNA-Bakteriophagen werden beiden Proteinen eine essentielle Rolle für den Prozess der DNA-Verpackung und Spaltung in Genomeinheiten zugeschrieben. Zunächst bindet die dimere pUL56 Form an die *cis* aktiven *pac*-Sequenzen, welche sich in den *a*-Sequenzen des HCMV-Genoms befinden (Bogner et al., 1998). Die Translokation der DNA in die Prokapside wird durch pUL56-vermittelte ATP-Hydrolyse



gewährleistet (Hwang und Bogner, 2002; Scholz et al., 2003). Anschließend wird durch die Bindung von pUL56 an das Prokapsid die Einschleusung des DNA in die Prokapside ermöglicht (Scheffczik et al., 2002). Der Vorgang der Verpackung wurde durch die abschließende Spaltung durch pUL89 abgeschlossen.



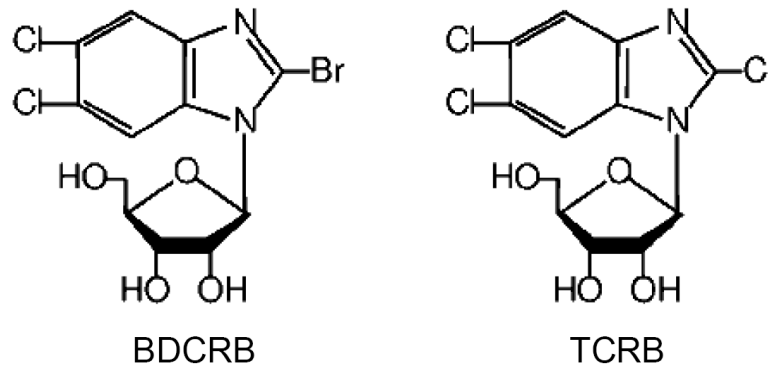
**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der DNA-Verpackung von HCMV (Bogner, 2002)**

Die sog. konkatemere DNA wird durch dem Replikationsmechanismus 'rolling circle' produziert. Die ersten Schritte der DNA-Verpackung beginnen mit der Bindung von pUL56 an die *pac* Sequenz. Anschließend erfolgt die erste Spaltung. Nach der Interaktion mit pUL89 wird die DNA zu den Prokapside transportiert. Während der nächsten Schritte wird pUL56 an der Prokapsid gebunden und die DNA verpackt. Nach der zweiten Spaltung in Genomeinheiten ist die DNA-Verpackungsschritt beendet.

## 1.6 Wirkung von Benzimidazol D-Ribonukleoside

Die Entwicklung der Benzimidazol D-Ribonukleoside als antivirale Substanz lässt sich bis in die 40er Jahre zurückführen. Damals wurde 5,6-dimethyl-1-( $\alpha$ -D-ribofuranosyl) Benzimidazol als eine Komponente von Vitamin B<sub>12</sub> gefunden (Beavan et al., 1949). Darüber hinaus wurde ein Analog von 5,6-chloro-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) Benzimidazol (DRB) als potentielle inhibitorische Substanz eingeleitet (Tamm et al., 1954). Aus dem initialen Experiment wurden DRB und sein Analog als spezifische wirksame Agenzien gegen Influenzaviren bekannt. Im Jahr 1960 wurde ein 2-chloro-

Analog von DRB als potentielle Anti-Krebs-Substanz durch Townsend (Townsend und Revankar 1970) entdeckt. Neben der Anti-Tumor-Wirkung wurde für TCRB eine hohe Aktivität gegen HCMV nachgewiesen (Townsend et al., 1995).

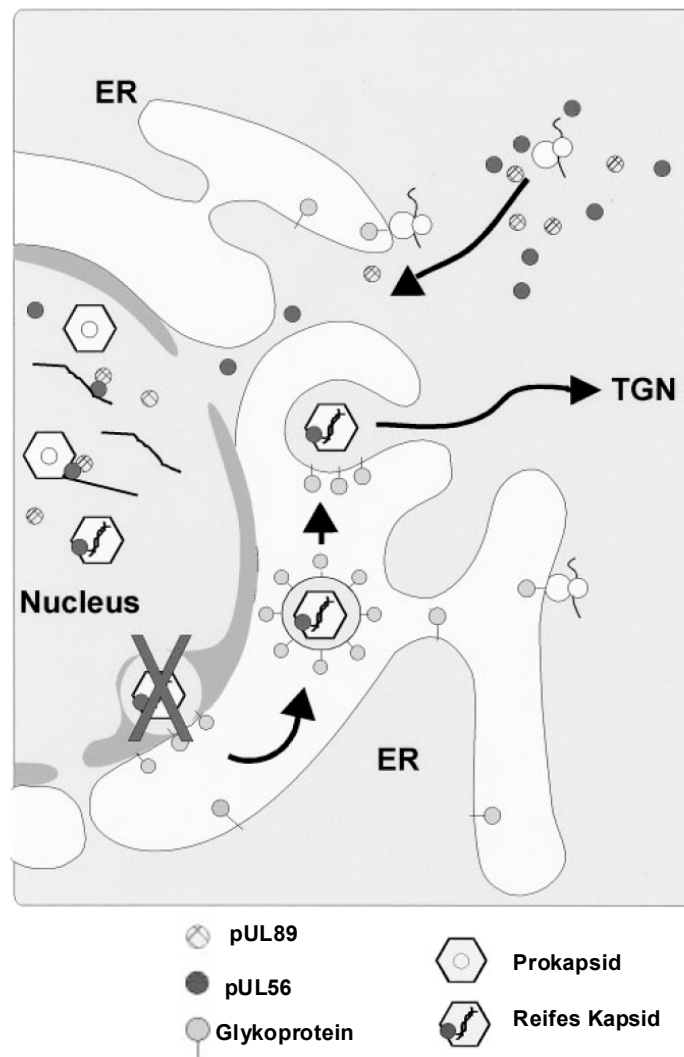


**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Benzimidazol D-Ribonukleoside**

Das Spektrum der antiviralen Aktivität von BDCRB und TCRB (Abb.1.5) ist spezifisch für Cytomegalovirus. Die beiden Substanzen sind gleichermassen wirksam gegen das humane und das Rhesus-CMV (North et al., 2004), weniger effektiv gegen GPCMV (Nixon und McVoy, 2004) und sehr wenig oder inaktiv gegen Nagetier-CMV. Interessanterweise haben die beiden Substanzen keine Wirkung auf andere Herpesviren wie z.B. HSV Type1, HSV Type2 und humane Herpes Virus-6. Obwohl BDCRB und TCRB eine hohe Aktivität *in vitro* haben, werden sie sehr schnell aufgrund der Spaltung der glykosidischen Bindung in Zuckermoleküle umgewandelt (Good et al., 1994). Aus diesem Grund wurden die Substanzen weiter entwickelt.

Die Wirksamkeit der Benzimidazol D-Ribonukleoside TCRB und BDCRB kann auf eine Inhibition der Terminase-Aktivität zurückgeführt werden (Krosky et al., 1998; Scholz et al., 2003). BDCRB inhibiert die HCMV DNA Prozessierung, an der die Terminase-Untereinheiten pUL56 und pUL89 beteiligt sind (Krosky et al., 1998; Underwood et al., 1998; Krosky et al., 2002). Wie mit Hilfe des ATPase-Aktivitäts-Assay gezeigt werden konnte, reduziert BDCRB die pUL56 assoziierte ATPase-Aktivität (Hwang et al., 2007). Infolgedessen wird die Translokation der konkatemeren DNA und die Verpackung in die Prokapside blockiert. BDCRB hat auch

einen inhibitorischen Effekt auf die Spaltung der viralen DNA (Scheffczik et al., 2002). Infolgedessen konnte gezeigt werden, dass BDCRB effektiv die virale Replikation inhibiert (Savva et al., 2004). Ausserdem befindet sich auch eine Reihe von potentiell antiviralen Substanzen in der Entwicklung. z.B. GW275175X, ein D-ribopyranosyl-Benzimidazole, das durch einen ähnlichen Mechanismus wie BDCRB aktiviert wird. Maribavir (1263W94), ein Benzimidazol L-Ribonukleosid, das einen inhibitorischen Effekt auf die DNA-Synthese und auch die Virus-Ausschleusung hat (Biron et al., 2002), befindet sich in der klinische Phase III.



**Abb. 1.6: Mechanismus des Terminaseinhibitors auf die virale HCMV Replikation (Bogner, 2002)**

Nach der Synthese im Cytoplasma werden die beiden Terminase Untereinheiten pUL56 und pUL89 in den Kern transportiert. In der späteren Phase der Infektion erfolgt das Kapside Assembly. Aus der DNA-Synthese resultiert viele Konkatermeren. BDCRB inhibiert die Spaltung der viralen DNA, an der pUL56 und pUL89 beteiligt sind, und die Verpackung in Prokapside.

## 2. Problemstellung

Die Inhibition der HCMV Terminase bietet einen attraktiven alternativen Ansatzpunkt für die antivirale Therapie. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Benzimidazol D-Ribonukleoside BDCRB und TCRB zur Inhibition der Terminase-Aktivität führen (Krosky et al., 1998; Scholz et al., 2003; Savva et al., 2004). Zwar wurde für die Benzimidazol D-Ribonukleoside eine starke inhibitorische Aktivität *in vitro* gezeigt, allerdings zeigten klinische Studien, dass BDCRB Derivate eine geringe metabolische Stabilität aufweisen (Chulay et al., 1999; Good et al., 1994; Drach et al., 2006). Um stabilere Moleküle zu erhalten, wurden weitere Benzimidazol D-Ribonukleosid Derivate durch Prof. L.B. Townsend (University of Ann Arbor, Michigan) synthetisiert. In der vorliegenden Arbeit sollen Wirkungsmechanismen von zwei neuen Benzimidazol D-Ribonukleosid Derivate auf ihre antivirale Wirkung analysiert werden. Zunächst sollen daher die antivirale Aktivität, die Zytotoxizität der Substanzen und die *in vivo* Stabilität bestimmt werden. Weiterhin soll die Auswirkung der Substanzen auf die Replikation von HCMV untersucht werden. Hierzu sollen die Analysen zur Freisetzung von Virionen und zum Einfluss auf die virale DNA-Bindung erfolgen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Aufklärung, inwieweit die Inhibitoren die DNA-Prozessierung beeinflussen. Infolgedessen sollen die Spaltung konkatemerer DNA und die DNA-Verpackung überprüft werden. Aufgrund der möglichen therapeutischen Anwendung soll die Wirkung der Substanzen auf klinischen HCMV-Isolaten, die aus Patientenserum isoliert wurden, überprüft werden. Infolgedessen soll nachgewiesen werden, ob die Substanzen einen inhibitorischen Effekt auf klinische HCMV-Isolate zeigen. Anschließend soll die Wirkung der Substanzen auf anderen Herpesviren überprüft werden. Die erzielten Ergebnisse können maßgebend für die Entwicklung neuer antiviraler Therapeutika sein.

### 3. Materialien

#### 3.1 Bezugsquellen

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen GE Healthcare (Freiburg), BioMerieux (Marcy l'Etoile), Bio-Rad (München), Bio Whittaker (Belgien), Dianova (Hamburg), Fluka (Steinheim), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Seromed (Berlin), Serva (Heidelberg) und VWR (Pennsylvania, USA) bezogen.

#### 3.2 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Standard Low-m <sub>r</sub> Agarose	Bio Rad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka, Steinheim
4,2-Diamino-2-phenylindiol (DAPI)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
DMP-30	Roth, Karlsruhe
Fluoprep™	BioMerieux, Marcy l'Etoile
Glycerin (87%)	Roth, Karlsruhe
Glycidether 100	Roth, Karlsruhe
Härther DBA	Roth, Karlsruhe
Härther MNA	Roth, Karlsruhe
Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Invitrogen, Karlsruhe
Prestained protein molecular-weight marker	Fermantas GMBH, St. Leon-Rot
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt

### 3.3 Grundstoffe für Kulturmedien

Dulbecco`s MEM (1x)	Seromed, Berlin
Fötales Kälberserum (FKS)	Hyclone Perio Science- Deutschland, Bonn
L-Glutamin (100x)	Seromed, Berlin
PBS	s. 3.11
Methylzellulose	Fluka, Steinheim

### 3.4 Antibiotika

Gentamycin (5000 U/ml – 5000 U.G./ml)	Biochrom AG, Berlin
---------------------------------------	---------------------

### 3.5 Enzyme

Trypsin/EDTA [4+1 (v/v)]	Biochrom AG, Berlin
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen

### 3.6 Kits

TNT-T7 Quick	Promega, Mannheim
Zytotoxizitäts-Test (CellTiter 96 <sup>®</sup> AQueous Assay)	Promega, Mannheim

### 3.7 Antikörper

#### 3.7.1 Monoklonale Antikörper

**mAb28-4:** Maus-anti-MCP Antikörper, bezogen von W. Britt, University of Alabama. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz 1:10 verdünnt verwendet.

**mAb58-15:** Maus-anti-pp65 Antikörper bezogen von W. Britt, University of Alabama. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz unverdünnt verwendet.

**mAb63-27:** Maus-anti-IE1 Antikörper, bezogen von T. Stamminger, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Andreoni et al., 1989). Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz unverdünnt verwendet.

**mAbM23:** Maus-anti-pUL112/113 Antikörper, bezogen von K. Radsak, Philipps-Universität Marburg (Yamamoto et al., 1998). Der Antikörper wurde unverdünnt verwendet.

**mAbBS510:** Maus-anti-pUL44 Antikörper, bezogen von B. Plachter, Universität Mainz. Der Antikörper wurde in der Immunfluoreszenz unverdünnt verwendet.

#### 3.7.2 Sekundäre Antikörper

Alle verwendeten Sekundärantikörper wurden von der Firma Dianova, Hamburg, bezogen.

#### Einsatz in der Immunfluoreszenz :

Anti-Maus F(ab')<sub>2</sub> Fragmente, Cy<sup>TM</sup>2 konjugiert (1:200 verdünnt)

Anti-Maus F(ab')<sub>3</sub> Fragmente, Cy<sup>TM</sup>3 konjugiert (1:400 verdünnt)

### 3.8 Sonstige Materialien

Röntgenfilme	CEA, Strängnäs (Sweden)
Deckgläschen (12 mm Durchmesser)	Marienfeld GmbH, Lauda-Könlghshofen
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
L-Methionine [ $^{35}\text{S}$ ] <i>in vitro</i> labeling	Hartmann Braunschweig Analytic,
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Nunc, Weisbaden
Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht

### 3.9 Geräte

Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
CCD-Kamera 2K MegaViewIII	Olympus, Japan
Fluoreszenz-Mikroskop (BX60)	Olympus, Japan
Geltrockner	Bio-Rad, München
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Photomikroskop Axiophot	Leica, Bensheim
Photospektrometer DU40	Beckmann, Glenrothes
Tecnai <sup>TM</sup> G2	FEI Company, Eindhoven
Thermo-Shaker TS-100	Boeckel & Co. (GmbH & Co.), Hamburg
Zentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen



### 3.10 Zellkulturmedien

#### DMEM-Kulturmedium für eukaryontische Zellen

Dulbecco`s MEM (1X)	930,0	ml/l
Glutamin 200 mM (10X)	10,0	ml/l
Natriumhydrogencarbonat (7,5 %)	50,0	ml/l
Penicillin-Streptomycin (100X)	10,0	ml/l

*ad aqua bidest.*

Zur Kultivierung der Zellen wurden dem Medium 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FKS) zugegeben, während unter Infektionsbedingungen lediglich 2 % (v/v) FKS zugesetzt wurden.

#### Methylzellulose-Kulturmedium für Plaque-Reduktion Test

Methylzellulose (0,5 % (w/v))	180	ml/l
L-Glutamin (200mM)	2	ml/l
NaH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (7,5 % (w/v))	5,8	ml/l
Gentamicin (50 mg/ml)	0,2	ml/l
FKS (100 %)	15	ml/l
EMEM (10X)	20	ml/l

### 3.11 Puffer

#### DNA-Bindungs-Assay Puffer

Tris-HCl (pH 8,0)	50	mM
Glycerin	10 %	(v/v)
DTT	1	mM
EDTA	1	mM
PMSF	1	mM

*ad aqua bidest.*

### **TN-Puffer**

Tris-HCl (pH 7,4)	50	mM
Natriumchlorid	100	mM
<i>ad aqua bidest.</i>		

### **Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4)**

Di-Natriumhydrogenphosphat	19,0	mM
Kaliumhydrogenphosphat	2,2	mM
Natriumchlorid	0,2	mM
<i>ad aqua bidest.</i>		

### **PBSO Puffer pH 7,4**

Natriumchlorid	137	mM
Kaliumchlorid	2,7	mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,4	mM
Di-Natriumhydrogenphosphat	100	mM
<i>ad aqua bidest.</i>		

### **Auftragspuffer für Protein (4-fach, reduzierend)**

Tris-HCl (pH 6,8)	200	mM
β-Mercaptoethanol	4 %	(v/v)
SDS	4 %	(w/v)
Glycerin	40 %	(v/v)
Bromphenolblau	0,01 %	(w/v)

*ad aqua bidest.*

### **TBE-Puffer (10X)**

## Materialien

---

Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	10 mM

*ad aqua bidest.*

### **Trypsin/EDTA pH 7,0**

Natriumchlorid	140 mM
Kaliumchlorid	5 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat	0,56 mM
D(+)-Glucose	5 mM
Tris-HCl	5 mM
EDTA in 0,25 %iger Trypsin-Lösung	0,01 %( v/v)

*ad aqua bidest.*

## **3.12 Zellkulturen**

### **Humane Vorhautfibroblasten (HFF)**

Primäre humane Vorhautfibroblasten ( HFF ) wurden aus dem Vorhautgewebe von ein bis sieben Tage alte Neugeborenen gewonnen. Bei den nachfolgenden Experimenten wurden Fibroblasten der Passage 10 - 25 verwendet.

### **Fi 301 Zellen**

Humane embryonale Lungenfibroblastenzelllinie, bezogen von Biowhittaker Verveirs, Belgien.

### **Rat2-Zellen**

**Embryonale Ratten Fibroblasten, bezogen von American Type Culture Collection CRL 1764.**

### **NIH-3T3 Zellen**

Murine Fibroblastenzellen, bezogen von American Type Culture Collection CRL 1658

### **3.13 Virusstämme**

#### **3.13.1 HCMV AD169**

Für Infektionen wurde der Laborstamm AD 169 verwendet, der ursprünglich von W.P. Rowe isoliert wurde (Rowe et al., 1956)

#### **3.13.2 GCV-sensitives klinisches HCMV Isolat**

Ein GCV-sensitives klinisches HCMV Isolat wurde von Herrn Dr. Klaus Korn (Institut für klinische und molekulare Virologie Erlangen) zur Verfügung gestellt und aus Patientenmaterial auf HFF-Zellen angezüchtet.

#### **3.13.3 GCV-resistentes klinisches HCMV Isolat**

Von Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus Hamprecht (Institut für medizinische Virologie Tübingen) wurde ein GCV-resistentes klinisches HCMV Isolat zur Verfügung gestellt und Labor im Kultur gebracht.

#### **3.13.4 Maus-Cytomegalovirus (MCMV)**

Virus des Stammes Smith (ATCC VR-194) wurde bezogen von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA (ATCC) und von Herrn PD. Dr. Wolfram Brune (Robert Koch Institut Berlin) zur Verfügung gestellt.

#### **3.13.5 Ratten-Cytomegalovirus (RCMV)**

Der RCMV (Stamm RA-70) wurde auf Rat2-Zellen angezüchtet.

#### **3.13.6 Herpes-simplex-Virus Typ-1 (HSV-1)**

Herpes-simplex-Virus Typ-1 (Stamm KOS) wurde auf HFF-Zellen angezüchtet und isoliert.

### 3.13.7 Varicella-Zoster-Virus (VZV)

Der Vakzine-Stamm V-Oka wurde aus dem Lebendimpfstoff (Varilrix; Glaxo-SmithKline, München) in HELF-Zellen angezüchtet und von Herrn Prof. Dr. Schönrich (Institut für medizinische Virologie Charite CCM Berlin) zur Verfügung gestellt.

### 3.14 Benzimidazol D-Ribonukleoside

Die Substanzen aus der Klasse der Benzimidazol D-Ribonukleoside wurden im Labor von Herrn Prof. Dr. Leroy B. Townsend (University of Michigan) synthetisiert. Stocklösungen (5 mg/ml) wurde in DMSO gelöst und bei -80°C gelagert.

**BDCRB:** 2-Bromo-5,6-dichloro-(1-β-D-ribofuranosyl) Benzimidazol

**BTCRB:** 2-bromo-4,5,6-trichlorl-1-(2,3,5-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl) Benzimidazol

**Cl<sub>4</sub>RB:** 2,4,5,6-Tetrachloro-1-(2,3,5-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl) Benzimidazol

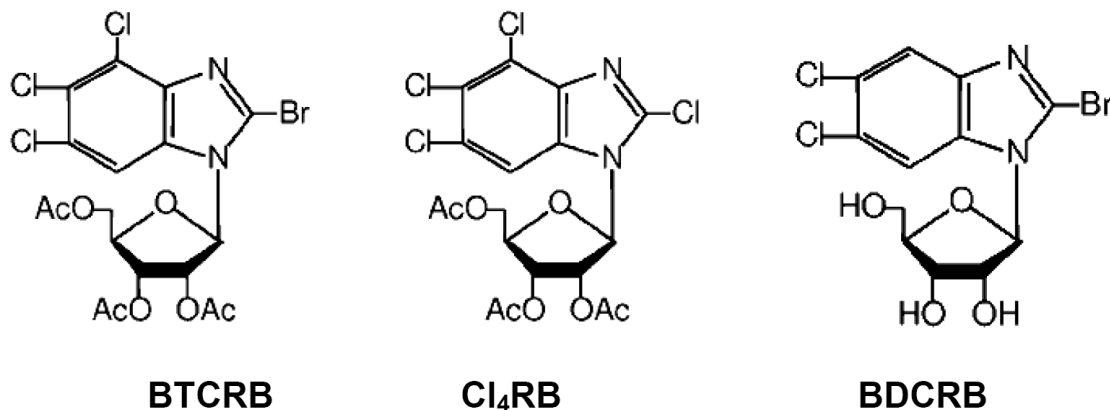


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der verwendeten Benzimidazol D-Ribonukleoside

## **4. Methoden**

### **4.1 Zellbiologische Methoden**

#### **4.1.1 Kultivierung humaner Vorhautfibroblasten (HFF) und Fi. 301-Zellen**

Die etablierten humanen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen) und humanen embryonalen Lungenfibroblastenzellen (Fi. 301) standen als Primärkulturen zur Verfügung. Sie wurden von Gefrierstocks ausgehend regelmäßig frisch angelegt und passagiert. Die Zellen wurden als Monolayer in Dulbecco's minimalem essentiellen Medium (DMEM) bei einer konstanten Temperatur von 37°C im offenen System bei 5 % iger CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Für das Passagieren wurden die konfluent gewachsenen Monolayer nach Entfernung des Kulturmediums zweimal mit PBS gewaschen. Um die Subkultivierung weiter fortzusetzen, wurden die adhären wachsenden Zellen mit einer auf 37 °C erwärmten Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst und konnten anschließend in einem Verhältnis von 1:2 bzw. 1:3 auf vorbereitete neue Kulturflaschen mit DMEM-Kulturmedium und Fötalem Kälberserum (FKS) 10% (v/v) ausgesät werden. Zum Ansetzen von Deckglaskulturen für Immunfluoreszenzen wurden vor der Aussaat der Zellen in eine 6-well-Kulturschale Deckgläschen in die Vertiefungen eingebracht und mit jeweils 2 ml DMEM überschichtet.

#### **4.1.2 Kultivierung von embryonalen Ratten Fibroblasten (Rat2 Zellen)**

Rat2 Zellen wurden in 12-Well-Kulturschalen unter Verwendung von EMEM-Medium bei 37 °C kultiviert. Für das Passagieren wurden die konfluent gewachsenen Zellen nach Absaugen des Kulturmediums einmal mit PBS gewaschen und durch Zugabe einer erwärmten Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in eine 12-well-Kulturschale überführt und mit EMEM (10 % FKS (v/v)) inkubiert.

#### **4.1.3 Kultivierung von Murinen Fibroblasten (NIH-3T3 Zellen)**

Murine Fibroblasten (NIH-3T3) wurden in EMEM Medium bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Zur Passsagierung

wurden die konfluenten Zellen nach Entfernung des Mediums zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer erwärmter Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen in eine 12-Well-Kulturschale überführt und mit EMEM Kulturmedium (10 % FKS (v/v)) inkubiert.

### **4.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden subkonfluente Monolayer-Kulturen zweimal mit Trypsin/EDTA-Lösung plus 10% (v/v) FKS gewaschen und nach Zugabe neuer Lösung vom Flaschenboden gelöst. Nach Sedimentation wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem DMEM-Kulturmedium plus 40 % (v/v) FKS resuspendiert und anschließend mit 2 ml eiskaltem DMEM-Kulturmedium plus 20% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) vermischt. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in Polypropylenröhrchen überführt und mit 70 % Ethanol bei -80 °C eingefroren. Zum Auftauen wurden die Polypropylenröhrchen direkt nach der Entnahme in 37 °C warmes Wasser überführt und die aufgetauten Zellen mit 5 ml vorgewärmtem DMEM-Kulturmedium plus 10% (v/v) FKS versetzt und sedimentiert. Die Zellen wurden in 5 ml DMEM plus 10% (v/v) FKS aufgenommen und in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen überführt.

### **4.1.5 Anzucht einer Virus-Stammsuspension (HCMV AD169)**

Für die Anzucht des HCMV-Laborstammes AD 169 wurden konfluente Monolayer humaner Vorhautfibroblasten (HFF) in 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen verwendet. Die Infektion erfolgte durch eine niedrige "multiplicity of infection" (m.o.i.) von ca. 0,1 in 50 ml DMEM-Kulturmedium und 10 % (v/v) FKS. Nachdem ca. 50 % der Zellen einen cytopathischen Effekt aufwiesen (im Durchschnitt nach 5 – 6 Tagen), wurde das Kulturmedium erneuert. Der virushaltige Kulturüberstand wurde nach 10 Tagen abgenommen. Durch Sedimentation (1000 x g, 5 min, 4 °C) wurden noch vorhandene Zellbestandteile entfernt. Jeweils 4 ml der zellfreien Virussuspension wurden anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 4.1.6 Titration einer Virus-Stammsuspension

Um die infektiösen Einheiten pro ml Virus-Stammsuspension zu bestimmen, wurde die Endpunktverdünnungsmethode durchgeführt. Hierzu wurden konfluente HFF Deckglaskulturen, die zuvor in einer logarithmischen Verdünnungsreihe auf eine Konzentration von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  verdünnt worden war, mit Virussuspensionen infiziert und für 24 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank inkubiert. Das im Zellkern lokalisierte HCMV Immediate early Genprodukt (IE-1) wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz (s. 4.3.2) unter Verwendung von Maus-anti-HCMV-IE IgG (1:50) und einem Cy<sub>3</sub>-konjugiertem Zweitantikörper (Ziege-anti-Maus-IgG, 1:50) nachgewiesen. Der Virustiter wurde durch Auszählen der Kerne pro Plättchen bestimmt und lag in der Regel bei  $5 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^7$  i.E./ml. Die durchschnittliche Anzahl der infektiösen Einheiten [i.E. (n)/ml] der Virussuspension ermittelt sich aus der letzten Verdünnung ( $10^{-x}$ ), in der noch wenige Kerne (y) in der Immunfluoreszenz positiv sind, nach der Formel:  $n = y \text{ mal } 10^x$  pro ml getestete Virussuspension.

### 4.1.7 Experimentelle Virusinfektion

Zur Infektion von konfluenten HFF mit HCMV AD 169 wurde, soweit nicht anders angegeben, eine MOI von 1 verwendet. Vor der Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann die entsprechende Menge Virussuspension in EMEM ohne FKS auf die Zellen gegeben und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit findet die Virusadsorption und die Infektion der Zellen statt. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit DMEM-Kulturmedium plus FKS 2 % (v/v) und bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-begasten Brutschrank kultiviert. Für die experimentelle Virusinfektion wurde unter Zugabe von Benzimidazole D-Ribonukleotide eine sterile Stammlösung (5 mg/ml in DMSO) vorbereitet. Für den Plaque-Reduktions Test wurden die infizierten Zellen mit dem Wirkstoff in verschiedenen Endkonzentrationen behandelt.

### 4.1.8 Anzucht eines GCV-sensitiven klinischen HCMV-Isolats

Vom Herrn K. Korn (Institut für klinische und molekulare Virologie Erlangen) wurde ein GCV-sensitives klinisches HCMV Isolat zur Verfügung gestellt und im Labor in Kultur genommen. Das HCMV-negative Patientenserum wurde auf konfluente



Monolayer humaner Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen) in 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen adaptiert. Nachdem ein zytopathischer Effekt von ca. 50% beobachtet wurde (nach ca. 8 - 10 Tagen), wurde das Kulturmedium erneuert. Der virushaltige Kulturüberstand wurde nach ca. 14 Tagen abgenommen. Durch eine Sedimentation (1000 x g, 5 min, 4 °C) wurden noch vorhandene Zellbestandteile entfernt. Die zellfreie Virussuspension wurde in jeweils 4 ml aliquotiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

### **4.1.9 Anzucht eines GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolats**

Vom Herrn K. Hamprecht (Institut für medizinische Virologie Tübingen) wurde ein GCV resistentes klinisches HCMV-Isolat zur Verfügung gestellt. Für die Anzucht dieses HCMV-Isolats wurden konfluente Monolayer humaner Vorhautfibroblasten (HFF) in 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen verwendet. Nachdem ein 50 %igen zytopathischen Effekt vorlag, wurde das Kulturmedium erneuert. Nach ca. 14 Tagen wurde das mittlerweile virushaltige Medium abgenommen und durch Sedimentation (1000 x g, 5 min, 4 °C) von noch eventuell vorhandenen Zellbestandteilen getrennt. Die zellfreie Virussuspension wurde anschließend in jeweils 4 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### **4.1.10 Plaque Reduktions Test**

Humane Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen) wurden auf 12-Well-Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Infektion wurde ein Virusstock mit einer MOI von 0,01 verwendet. Hierzu wurden konfluente HFF-Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann die entsprechende Menge einer Virussuspension in EMEM- Kulturmedium ohne FKS auf die HFF-Zellen gegeben und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Infektion wurden die Inhibitoren in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt und anschließend mit 2 ml Methylzellulose überschichtet. Nach ca. 8 Tage wurden die infizierten Zellen mit Kristallviolett (0,2 % (w/v) in 20 % EtOH) ca. 5 min gefärbt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser angehalten. Danach wurden die gefärbten Zellen bei RT getrocknet. Die Anzahl der Plaques wurde mit Hilfe eines

Lichtmikroskops bestimmt, wobei stets Doppelbestimmungen erfolgten. Indem die Anzahl der Plaques der infizierten, unbehandelten Zellen auf 100% gesetzt wurde, erhielt man darauf bezogen die Werte der Reduktion.

### **4.1.11 Wachstumskurve**

Humane Fibroblasten wurden mit dem Laborstamm AD169 (MOI=1) in Abwesenheit und Anwesenheit von Inhibitoren (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) infiziert. Der infizierte Zellkulturüberstand (Zeitraum von 24 bis 96 Stunden) wurde gesammelt und anschließend bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurde der virushaltige Zellkulturüberstand wiederum auf neue HFF-Zellen gegeben und bei 37°C 1,5 h inkubiert. Nach der Infektion wurde das Inokulum abgenommen und anschließend mit 2 ml Methylzellulose überschichtet. Nach ca. 8 Tagen wurde die Anzahl der ausgebildeten Plaques mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet.

### **4.1.12 Stabilitätsanalyse *in vivo***

Die Inhibitoren BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB wurden in einer Konzentration von 10 µM mit humanen Fibroblasten (HFF-Zellen) 48 h vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und auf AD169-infizierte HFF-Zellen gegeben (1 µM und 0,2 µM Endkonzentration pro 12-Well-Kulturschale) und anschließend mit 2 ml Methylzellulose überschichtet. Nach ca. 8 Tagen wurden die infizierten Zellen mit Kristallviolett (0,2 % (w/v) in 20 % EtOH) gefärbt. Der inhibitorische Effekt wurde über die Anzahl der Plaques mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt.

### **4.1.13 Bestimmung der Abhängigkeit von der Zeit der Zugabe**

HFF-Zellen wurde in einer 24-Well-Kulturschale bis zur Konfluenz kultiviert und mit HCMV AD169 infiziert (MOI=0,01). Die Inhibitoren BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB wurden in einer Konzentration von 10 µM zu verschiedenen Zeitpunkten (p.i. 0 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h) eingesetzt. Nach einer Infektionszeit von 7 Tage wurden die gebildeten Plaques mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet. Indem die Anzahl

der Plaques der infizierten, unbehandelten Zellen auf 100% gesetzt wurden, erhielt man darauf bezogen die Werte der Reduktion.

### **4.1.14 Zytotoxizitäts Test (MTS-Test)**

Der MTS-Test ist ein Zytotoxizitäts Test, das zur der Bestimmung der Stoffwechselaktivität, bzw. der Anzahl proliferativer Zellen in einer Zellkultur eine kalorimetrische Methode darstellt. Zur Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB, und BDCRB) auf die Zellproliferation wurde der MTS-Assay Kit (CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Assay von Promega) verwendet. Teilungsfähige Zellen können von apoptotischen Zellen unterschieden werden, da sie eine aktive Dehydrogenase besitzen, die das Tetrazoliumpräparat MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) mit Hilfe des Elektronenkopplers PMS (Phenazinmethozulfat) in ein Formazanprodukt umsetzen kann. Dieses Endprodukt kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm nachgewiesen werden. Zur Messung des MTS-Test wurde eine bestimmte Zellzahl ( $1 \times 10^3$  Zellen/Well) der HFF-Zellen auf eine 96-Loch-Kulturschale mit 100 µl EMEM-Medium ausgesät und für 24 h in 5%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C inkubiert, anschließend wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und mit 100 µl EMEM-Medium versehen. Die Doppelreaktionsansätze der jeweiligen Inhibitoren wurden für 7 Tagen bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten gleiche Ansätze ohne Inhibitoren. Danach wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit je 100 µl des gleichen Mediums wieder überschichtet. Als Nullkontrolle für die Messung der Eigenabsorption des Mediums dienten 4 Vertiefungen mit Medium ohne Zellen. Zusätzlich wurden pro Vertiefung 20 µl der MTS/PMS-Lösung (20:1) zugegeben und anschließend bei 37°C 4 h inkubiert. Dies führte zur Freisetzung des durch metabolische Umsetzung gebildeten Formazans. Schließlich erfolgte die spektralphotometrische Vermessung der Formazanlösung bei 490 nm mittels ELISA-Plattenreader. Hierbei ist die bei 490 nm gemessene Menge an Formazanprodukt direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in der Zellkultur.

---

## 4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Die SDS-Polyacrylamidgele bestehen aus einem 8 bzw. 10% igen Trenngel, das mit einem 3,75% igen Sammelgel überschichtet wurde. Die Proteinextrakte wurden mit  $\frac{1}{4}$  Volumen 4-fach Probenpuffer versetzt, zur Denaturierung für 5 min bei 95 °C inkubiert und in die Taschen des Sammelgels gegeben. Zum Einwandern der Proben in das Sammelgel wurde zunächst eine Stromstärke von 15 mA angelegt, die zur Auftrennung der Proteine im Trenngel auf 20 mA erhöht wurde. Um das Molekulargewicht zu bestimmen, wurde ein farbig markierter Molekulargewichtsmarker als Größenstandard parallel aufgetragen. Zur Darstellung von aufgetrennten Proteinen wurde eine Autoradiographie bzw. eine Coomassie-Färbung verwendet.

#### Sammelgel (3,75%)

Acrylamid	3,75 % (w/v)
N,N`-Methylenbisacrylamid	0,1 % (w/v)
Tris-HCl (pH6,8)	125,0 mM
SDS	0,1 % (w/v)
APS(Ammoniumpersulfat)	0,04 % (w/v)
TEMED (N,N,N`,N` - Tetramethyl-ethylen-diamin)	0,1 % (v/v)

*ad aqua bidest.*

### **Trenngel (8% - 10%)**

Acrylamid	0,8 % (w/v)
	10,0 % (w/v)
Glycerin(87%)	5,0 % (v/v)
N,N`-Methylenbisacrylamid	0,21 % (w/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	370,0 mM
SDS	0,1 % (w/v)
APS	0,1 % (w/v)
TEMED	0,1 % (v/v)

*ad aqua bidest.*

### **Elektrophorese-Puffer**

Glycin	200 mM
Tris	25,0 mM
SDS	0,1 % (v/v)

*ad aqua bidest.*

### **4.2.2 Coomassie-Färbung**

Die direkte Proteinfärbung erfolgte durch 30-minütige Inkubation des Gels in der Coomassie-Färbelösung. Das Gel wurde anschließend mit Entfärbelösung über 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden behandelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Um den Alkohol in der Entfärbungslösung zu beseitigen, wurde das Gel mit H<sub>2</sub>O für 10 min gewaschen. Anschließend wurde das Gel zwischen Cellophan-Folien getrocknet.

### **Coomassie-Färbelösung**

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,25 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Ethanol	40 % (v/v)

*ad aqua bidest.*

### Entfärbelösung

Essigsäure	10 % (v/v)
Ethanol	40% (v/v)
<i>ad aqua bideest.</i>	

#### 4.2.3 Autoradiographie

Um radioaktiv markierte Proteine darzustellen, wurde das Gel zunächst mit Coomassie-Färbelösung für 30 min gefärbt und anschließend mit Entfärbelösung für 1½ h behandelt, um die Proteine zu fixieren. Das Gel wurde im Vakuumtrockner auf Whatman-Papier getrocknet. Anschließend wurde das Gel mit einem Biomax-Röntgenfilm in einer lichtundurchlässigen Kassette exponiert. Nach unterschiedlichen Expositionszeiten wurde der Röntgenfilm entwickelt.

### 4.3 Molekularbiologische Methode

#### 4.3.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung sehr großer DNA-Fragmente wie z.B. viraler DNA über das Anlegen von elektrischen Impulsen in einem Winkel von je 60° zur Laufrichtung. Zur Isolierung intrazellulärer viraler DNA werden AD169-infizierte HFF-Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen zunächst vom Boden gelöst, sedimentiert (3.000 x g, 5 min) und mit PBS gewaschen (3.000 x g, 5 min). Die sedimentierten Zellen werden in 100 µl L-Puffer aufgenommen, mit der gleichen Menge LMP-Agarose (Biorad, München), sowie Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und in Blockform abgekühlt. Die Lyse der Zellen erfolgt bei 50°C in einem Eppendorf-Cup mittels Lysepuffer, in dem Proteinase K (10 mg/ml) frisch zugesetzt wird. Dieser wird nach 3 h nochmals ausgetauscht und die Lyse erfolgt üN. Am Morgen des nächsten Tages wird der Lysepuffer erneut ausgetauscht und nach ca. 5 h abgenommen, durch TE 10/10 ersetzt und üN bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wird der TE 10/10-Puffer ausgetauscht und erneut üN inkubiert. Anschließend werden die Gelblöcke zweimal für 30 min in 0,5 x TBE-Puffer äquilibriert und in ein 1%iges LMP-Agarose-Gel eingebracht. Der Gellauf findet in 0,5x TBE für 20 h bei 14°C mit einem

Pulswinkel von 120° und einer Pulszeit von 2-20 s bei 6 V/cm statt. Das Gel wird im Anschluß für 1 h mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

### **L-Puffer pH 7,5**

Tris/HCl	10 mM
NaCl	20 mM
EDTA	100 mM

### **Lysepuffer**

L-Puffer + 1% Na-Sarkosyl, 100 µg/ml Proteinase K

### **TE 10/10-Puffer pH 8,0**

Tris/HCl	10 mM
EDTA	10 mM

## **4.3.2 DNA-Bindungsexperimente**

### **4.3.2.1 *In vitro*-Translation von Proteinen**

Bei der *in vitro* Translation werden Proteine in einem zellfreien System direkt von einem Expressionsplasmid in einer gekoppelten Transkriptions/Translations-Reaktion über einen T7-Promoter exprimiert. Dabei werden die Proteine durch Zugabe von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin (spezifische Aktivität: 1000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. 1 µg Plasmid werden mit 20 µCi [<sup>35</sup>S]-Methionin (Hartmann Analytic, Braunschweig) und 40 µl TNT T7 Quick Master Mix (Promega, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 90 min bei 30°C inkubiert. Die Proteine werden im Anschluss direkt für Bindungsexperimente eingesetzt.

### **4.3.2.2 *In vitro*-DNA-Bindungsexperimente**

Im *in vitro*-DNA-Bindungs-Nachweis wird die Fähigkeit eines Proteins zur Bindung an doppelsträngigen DNA überprüft. Dazu werden 200 mg doppelsträngige DNA-

Zellulose (Sigma-Aldrich, Steinheim) auf eine Säule geladen und mit 2 ml DNA-Bindungspuffer äquibriert. 50 µl [<sup>35</sup>S]-radioaktiv markiertes Protein aus einer *in vitro* Translationsreaktion wird in 0,5 ml DNA-Bindungspuffer über die Säule gegeben und nach dreimaligem Waschen mit 0,5 ml DNA-Bindungspuffer in 0,5 ml Fraktionen mit steigenden Salzkonzentrationen (200, 400, 800, 1500 und 2000 mM NaCl) eluiert. Je 30 µl Eluat sowie 3 µl *in vitro* translatiertes Protein werden über SDS-PAGE (4.2.1) und Autoradiographie analysiert.

## 4.4 Immunologische Methoden

### 4.4.1 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz diente zum Nachweis von Proteinen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper in infizierten Zellen, die auf Glasplättchen kultiviert waren. Bei der indirekten Immunfluoreszenz erfolgt der Nachweis über einen markierten Zweitantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist. Die Glasplättchen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 %iger Paraformaldehydelösung bei RT für 20 Minuten fixiert. Um freie Aminogruppen abzusättigen, wurden die Zellen mit einer Ammoniumchloridlösung für 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellmembranen mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 5 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem spezifischen Erstantikörper (1:10) in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 20 Minuten bei RT im Dunkeln. Als Zweitantikörper dienten Fluoreszenz-markierte F(ab<sub>2</sub>)-Fragmente von Immunglobulinen (IgG's), Cy3 bzw. Cy2-konjugierte Antikörper, die im Verhältnis 1:200 mit 3 % BSA-Lösung verdünnt wurden. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS und *aqua bidest.* gewaschen. Die behandelten Glasplättchen wurden separat auf einen Objektträger gegeben, auf dem sich jeweils ein Tropfen Eindeckmaterial Fluoprep<sup>TM</sup> befand. Anschließend wurden die Glasplättchen mit Nagellack eingefasst, um das Austrocknen der Präparate zu verhindern. Die Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (BX60, Olympus). Bei der indirekten Doppelimmunfluoreszenz wurden die zwei spezifischen Erstantikörper nacheinander



inkubiert, wohingegen die fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper gemeinsam inkubiert wurden.

Bei vielen Immunfluoreszenz-Experimenten wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,2-Diamino-2-phenylindiol) verwendet, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Hierzu wurden die Zellen in PBS gewaschen und für 2 min mit einer DAPI-Lösung inkubiert, die zuvor im Verhältnis 1:200 in 3 % BSA Lösung verdünnt worden war. Anschließend wurden die Glasplättchen in PBS und *aqua bidest.* gewaschen und wie oben beschrieben eingedeckt und analysiert.

### 3% BSA-Lösung

BSA	3% (w/v)
PBS	s. 3.10

## 4.5 Elektronenmikroskopie

### 4.5.1 Fixierung und Einbettung von Zellen für die Elektronenmikroskopie

HCMV infizierte HFF-Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen wurden in einer lauwarmen Fixierlösung (2,5 % (w/v) Glutaraldehyd in Hepes-Puffer) geerntet und 90 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen sedimentiert (3500 rpm, 10 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellsediment dreimal mit *aqua bidest* (3500 rpm, 5 min) gewaschen. Die Zellen wurden in *aqua bidest* resuspendiert, in einem Eppendorf-Cups überführt und erneut sedimentiert (14000 rpm, 5 min). Nach der Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit Osmiumtetroxid (1 % (w/v) in *aqua bidest*) für 60 min bei RT angefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit *aqua bidest* gewaschen (3500 rpm, 15 min). Danach wurden die Zellen mit Tannin (0,1 % (w/v) in Hepes-Puffer) für 60 min bei RT inkubiert, anschließend zweimal mit Natriumsulfat (1 % (w/v) in Hepes-Puffer) (3500 rpm, 5 min) und zweimal mit *aqua bidest* gewaschen (3500 rpm, 5 min). Nach Dehydrierung in 50 % Ethanol für je 3 x 5 min wurden die Zellen für 30 min mit Uranylacetat (0,2 % (w/v) in 70 % Ethanol) gefärbt, gefolgt von weiteren Dehydrierungsschritten in 90 % bzw. 100 % Ethanol für je 3 x 10 min und in 100 % Propylenoxid für je 2 x 20 min. Im Anschluss wurden die Zellen mit 33 % Epon in Propylenoxyd bzw. 66 % Epon in Propylenoxyd für 60 min eingebettet und sedimentiert (2000 rpm, 5 min). Die Zellen wurden in Kapsel (Beem-

Kapseln®Polyethylen-Kapseln mit pyramidenförmiger Spitze; Plano, Wetzlar) überführt und mit 100 %igen frischem Epon aufgefüllt. Zur Polymerisation wurden die Proben für 72 h bei 60 °C inkubiert. Die Herstellung von Ultradünnschnitten erfolgte mit einem Ultramikrotom. Die Schnitte wurden auf mit Pioloform beschichtete Kupfer-Netzchen übertragen, für 10 min mit Uranyl-Acetat (1 % (w/v) in 40% Ethanol) sowie für 10 min mit Bleizitrat in einer feuchten Kammer angefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse mit dem Elektronmikroskop Tecnai™G2 (FEI Company, Eindhoven) bei einer konstanten Spannung von 120 kV. Die Bilder wurden mit einer 2K Digital-Kamera MegaView III (Olympus) und dem Programm SIS (Olympus) aufgenommen.

### Hepes-Puffer pH 7,4

HEPES	20 mM
Nach	150 mM
<i>aqua bidest</i>	

### Herstellung von Epon

Lösung A: 20 ml	Glycidether 100
32 ml	Härter DBA
Lösung B: 32 ml	Glycidether 100
28 ml	Härter MNA

- Lösungen 15 min rühren
- beide Lösungen zusammenfügen; 15 min rühren
- 1.5% Beschleuniger DMP-30 dazu geben (1,68 ml); 15 min rühren

## 5. Ergebnisse

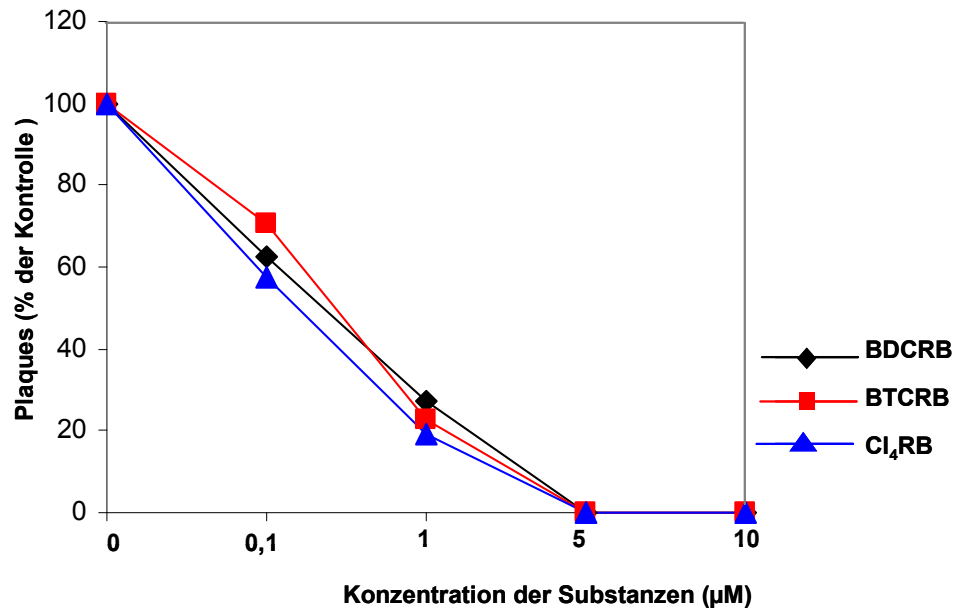
### 5.1 Analyse neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside

Der antivirale Effekt von Benzimidazol D-Ribonukleosid Derivaten, die in Zusammenarbeit mit Prof. J.C. Drach und Prof. L.W. Townsend (University of Ann Arbor, USA) zur Verfügung gestellt wurden, sollen mit Hilfe verschiedene Methoden charakterisiert werden. Der erste Schritt, um potentiell inhibitorische Substanzen zu analysieren, ist die Testung der Wirkung in Zellkultur. Darüber hinaus wurden Versuche in Zellkultur durchgeführt, wobei infizierte und nicht infizierte humane Fibroblasten in Gegenwart des jeweiligen Inhibitors kultiviert wurden. Danach wurde der inhibitorische Effekt durch die Anzahl der gebildeten Plaques ausgewertet. Darüber hinaus soll die zytotoxische Konzentration der Substanzen bestimmt werden. Weiterhin wurde die Stabilität neuer Substanzen analysiert, um den Vorteil in der zukünftigen Anwendung in der antiviralen Therapie zu überprüfen.

#### 5.1.1 Antivirale Aktivität der Substanzen

Ein wichtiges Kriterium für die Wirksamkeit eines Inhibitors in Zellkultur ist die Reduktion von Plaques. Nach Infektion mit HCMV AD 169 (MOI 0,01) von humanen Fibroblasten wurden die Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und anschließend mit Methylzellulose überschichtet. Nach ca. 8 Tagen wurde die Anzahl der ausgebildeten Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie bestimmt. Indem die Anzahl der Plaques der infizierten Zellen ohne Inhibitor auf 100% gesetzt wurde, erhielt man darauf bezogen die Werte der Reduktion.

In der Grafik ist deutlich zu erkennen, dass alle Substanzen sehr wirksam gegen HCMV Infektion sind (Abb. 5.1). Der IC<sub>50</sub>-Wert, die 50 %ige inhibitorische Konzentration einer Substanz, von BDCRB lag bei 0,49 µM und von BTCRB bei 0,50 µM (Tabelle 5.1). Cl<sub>4</sub>RB ist effektiver als andere Substanzen, da diese Substanz einen wesentlich geringeren IC<sub>50</sub> Wert von 0,25 µM aufweist (Tabelle 5.1).



**Abb. 5.1: Antivirale Aktivität der Substanzen**

Humane Fibroblasten wurden in Abwesenheit oder Gegenwart der Substanzen mit HCMV AD169 (MOI 0,01) infiziert. Nach 8 Tagen wurden die infizierte Zellen mit Kristallviolett (0,2 % (w/v) in 20 % EtOH) gefärbt. Die inhibitorische Wirkung in Zellkultur wurde über die Anzahl der Plaques mittels Lichtmikroskopie ausgewertet.

**Tabelle 5.1 : IC<sub>50</sub>-Wert der Substanzen**

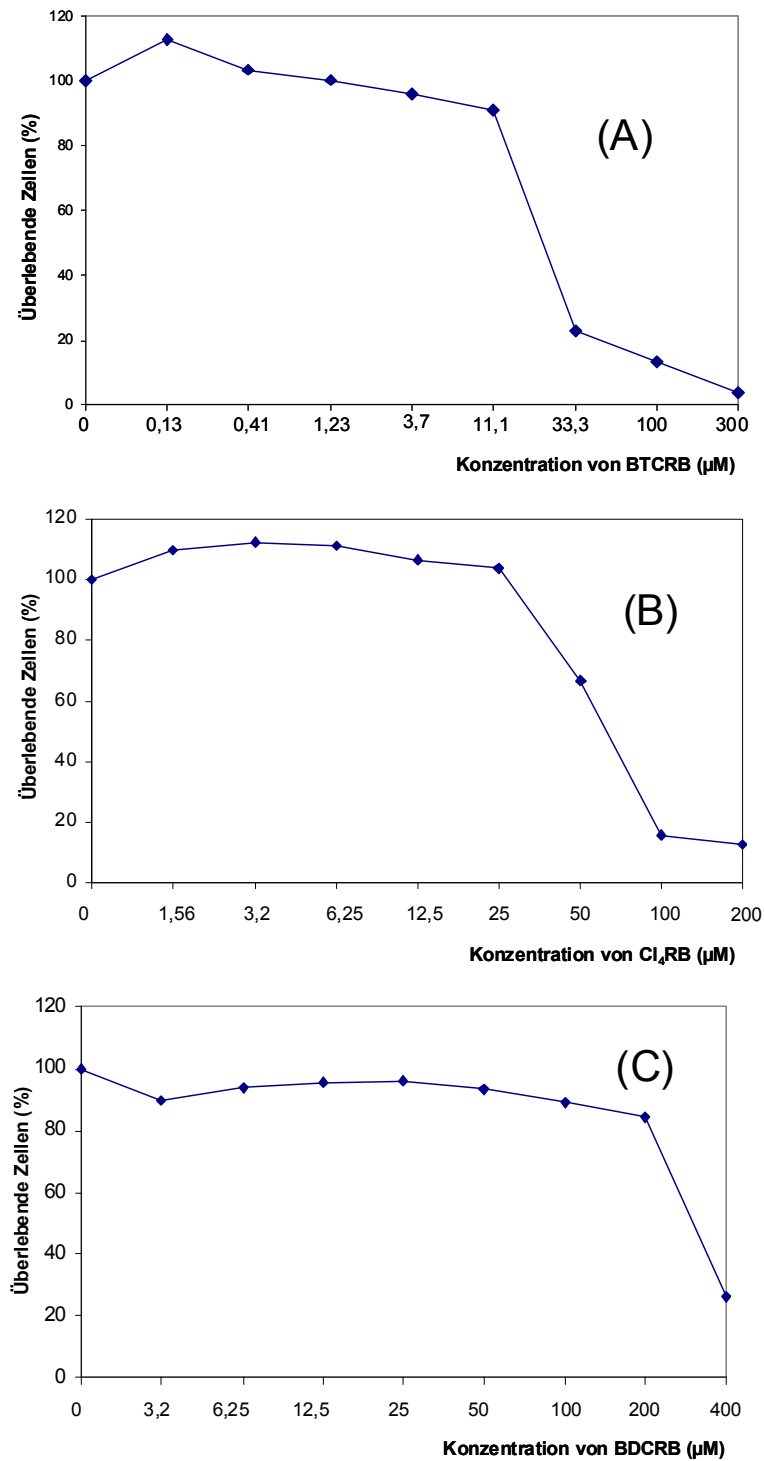
Substanz	IC <sub>50</sub> -Wert (µM)
BTCRB	0,50 ± 0,18
Cl <sub>4</sub> RB	0,25 ± 0,19
BDCRB	0,49 ± 0,29

### 5.1.2 Zytotoxizität der Substanzen

Um den Einfluss der Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) auf die Zellproliferation nachzuweisen, wurde ein Zytotoxizitäts Test (MTS-Test) durchgeführt. Zunächst wurden humane Fibroblasten in einer 96-Loch-Kulturschale bis zur Konfluenz kultiviert. Die Substanzen wurden in entsprechenden Verdünnungen auf den konfluenten Zellrasen gegeben und 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und mit 100 µl gleichen Mediums überschichtet. Dazu wurden

pro Vertiefung 20 µl der MTS / PMS-Lösung (20:1) eingesetzt und anschließend bei 37 °C für 4 h inkubiert.

Die Messung erfolgte dabei im ELISA-Plattenreader bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Die in diesem Test gemessene Menge an gebildeten Formazan ist proportional zu der Anzahl lebender Zellen in der Zellkultur. Als Kontrolle dienten gleiche Ansätze ohne Inhibitoren. Als Nullwert erfolgte die Messung der Eigenabsorption des Mediums, in dem 4 Vertiefungen mit Medium ohne Zellen verwendet wurden. Für die pro Konzentration erhaltenen Werte wurden der Mittelwert und die Standardabweichungen berechnet. Der erhaltene  $CC_{50}$ -Wert, die 50 %ige zytotoxische Konzentration aller Substanzen, ist in Tabelle 5.2 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass BDCRB einen höheren  $CC_{50}$ -Wert im Vergleich zu den anderen Substanzen hat (Tabelle 5.2).



**Abb. 5.2: Zytotoxizität der Substanzen (MTS-Test)**

Humane Fibroblasten wurde bis zur Konfluenz kultiviert und mit den Substanzen (BTCRB (A), Cl<sub>4</sub>RB (B), BDCRB (C)) in entsprechenden Verdünnungen bei 37 °C für 7 Tage inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen mit MTS/PMS-Lösung (20:1) weiterhin bei 37 °C für 4 h inkubiert. Danach wurde das gebildete Formazan mittels ELISA reader bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Die gemessene Absorption ist direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen in der Zellkultur. Die Zellüberlebensrate wurde durch das Verhältnis zwischen Proben und Kontrolle ausgewertet.

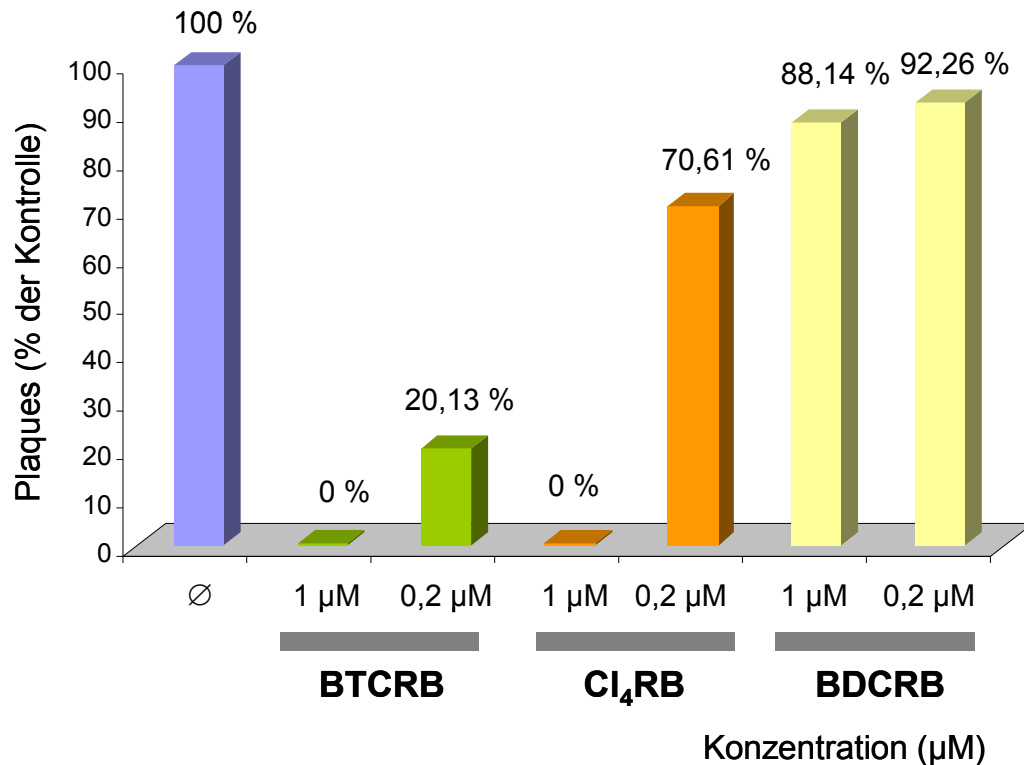
**Tabelle 5.2: CC<sub>50</sub>-Wert der Substanzen**

Substanzen	CC <sub>50</sub> -Wert (µM)
BTCRB	27,9 ± 2,02
Cl <sub>4</sub> RB	66,7 ± 2,57
BDCRB	313,6 ± 17,21

### 5.1.3 Stabilität der Substanzen

Um nachzuweisen, ob die getesteten Substanzen auch *in vivo* wirksam sind, wurde die Stabilität der Substanzen analysiert. Zunächst wurden die Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) in einer Konzentration von 10 µM mit humanen Fibroblasten 48 h vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde der Zellkulturüberstand auf HCMV AD169 infizierten HFF-Zellen gegeben (1 µM und 0,2 µM Endkonzentration) und anschließend mit Methylzellulose überschichtet. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Inhibitoren. Nach ca. 8 Tagen wurde der inhibitorische Effekt in Zellkultur über die Anzahl der gebildeten Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie ausgewertet.

Im Fall von BTCRB war die Stabilität *in vivo* bei einer Endkonzentration von 0,2 µM um ca. 80 % reduziert, während die Effektivität bei Cl<sub>4</sub>RB nur um ca. 30 % reduziert wurde (Abb. 5.3). Dagegen konnte im Fall von BDCRB eine Reduktion der Stabilität *in vivo* sowohl bei einer Endkonzentration von 0,2 µM als auch bei 1 µM nachgewiesen werden. Somit scheint BTCRB die beste Stabilität *in vivo* zu haben.



**Abb. 5.3: Stabilität der Substanzen**

Die Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) wurden mit HFF-Zellen für 48 h vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde der Zellkulturüberstand auf neue infizierten HFF-Zellen bis zur Endkonzentration von 0,2 µM und 1 µM gegeben. Nach ca. 8 Tagen wurde die inhibitorische Wirkung in Zellkultur über die Anzahl der Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie ausgewertet.

## 5.2 Wirkung neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside auf die HCMV DNA-Replikation

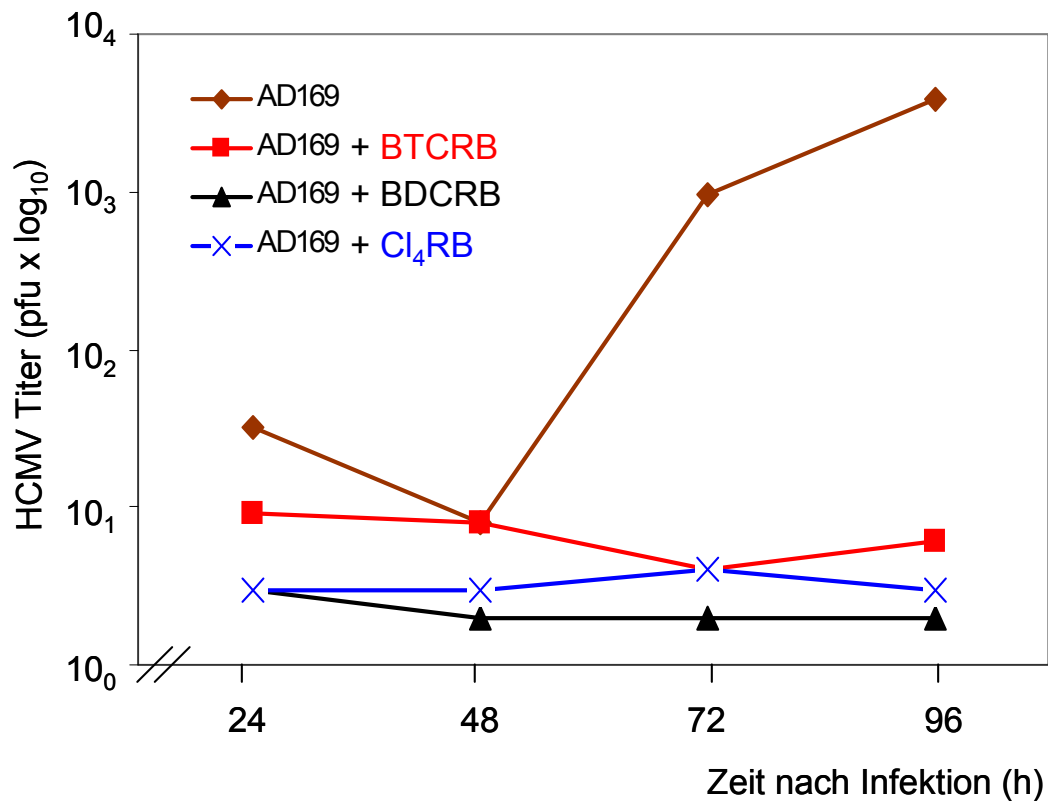
Die antivirale Wirkung neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside auf die HCMV DNA-Replikations soll untersucht werden. Hierzu soll eine Wachstumskurve als ersten Anhaltspunkt der Wirkung des Inhibitors im Verlauf der Infektion erstellt werden. Anschließend sollen weitere Experimente zum Einfluss auf den viralen Replikationszyklus, die DNA-Bindung, die Spaltung konkatemerer DNA, die virale Proteinexpression sowie auf die DNA-Verpackung durchgeführt werden.



### 5.2.1 Einfluss der Inhibitoren auf die Freisetzung von Virionen

Um zu untersuchen, ob sich die Viren in ihrem Replikationsverhalten in Abwesenheit und Anwesenheit der Substanzen unterscheiden, wurde eine Infektionskinetik für die viralen Freisetzung durchgeführt. Humane Fibroblasten wurden mit HCMV AD169 (MOI 1) in Abwesenheit und Anwesenheit von 10  $\mu$ M BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB infiziert. Der Zellkulturüberstand (Zeitraum von 24 bis 96 Stunden) wurde gesammelt und anschließend bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde der virushaltige Zellkulturüberstand wiederum auf neue HFF-Zellen gegeben und bei 37 °C 1,5 h inkubiert. Nach der Infektion wurde das Inokulum abgenommen und anschließend mit Methylzellulose überschichtet. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Inhibitoren. Nach 8 Tagen wurde die Anzahl der Plaques mittels Lichtmikroskopie ausgezählt. Anschließend wurde die antivirale Aktivität über die Reduktion der gebildeten Tochtervirionen (Wachstumskurve) quantifiziert.

In der Graphik ist zu erkennen, dass sich eine deutliche Differenz in der viralen Freisetzung zeigt (Abb. 5.4). Die Freisetzung von Virionen in Anwesenheit der Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) wurde stark unterdrückt, so dass keine Nachkommenviren aufgrund des inhibitorischen Effekts der Substanzen gebildet wurden.



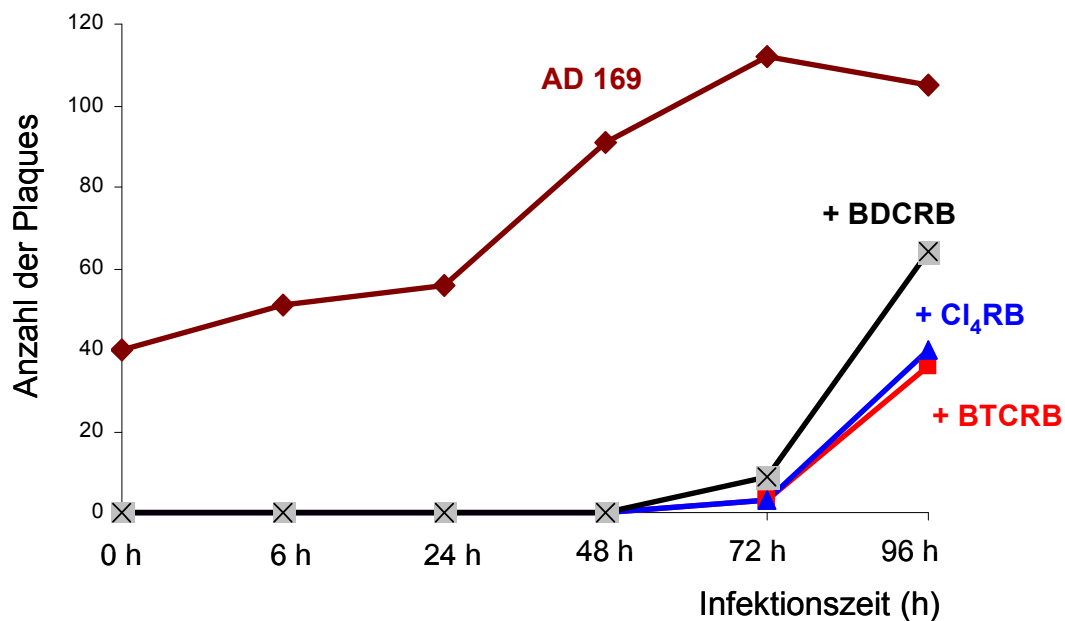
**Abb. 5.4: Wachstumskurve für die virale Freisetzung**

HFF-Zellen wurden mit HCMV AD169 in Ab- bzw. Anwesenheit der Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) infiziert. Der infizierte Zellkulturüberstand wurde (24 h, 48 h, 72 h, 96 h p.i.) abgenommen und auf neue HFF-Zellen gegeben. Nach ca. 8 Tagen wurde die inhibitorische Wirkung in Zellkultur über die Anzahl der gebildeten Plaques mittels Lichtmikroskopie ausgewertet.

### 5.2.2 Wirkung der Inhibitoren auf den viralen Replikationszyklus

Um nachzuweisen, in welchem Stadium des Replikationszyklus die Substanzen einen inhibitorischen Effekt haben, erfolgte die Zugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten. HFF-Zellen wurden in 24-well-Kulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert und mit HCMV AD169 (MOI 0,01) infiziert. Die Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) wurden in einer Konzentration von 10 µM zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6, 24, 48, 72, 96 h p.i.) zugegeben. Als Kontrolle dienten identische Ansätze unbehandelter Zellen. Nach einer Infektionszeit von 7 Tagen wurde der inhibitorische Effekt über die Anzahl der gebildeten Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie ausgewertet.

Alle Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) zeigten eine Hemmung der Plauebildung bis zu den Zeitpunkten (0, 6, 24, 48 h p.i.). Wohingegen nach einer Infektionszeit von 72 h trat das Plaues abhängig von den jeweiligen Substanzen auf. Interessanterweise hatten BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB ähnliche inhibitorische Effekte bis zu den Zeitpunkten 72 h und 96 h (Abb. 5.5). Im Gegensatz dazu war der Effekt von BDCRB geringer.



**Abb. 5.5: Abhängigkeit der inhibitorischen Effekte von der Zeit der Zugabe**

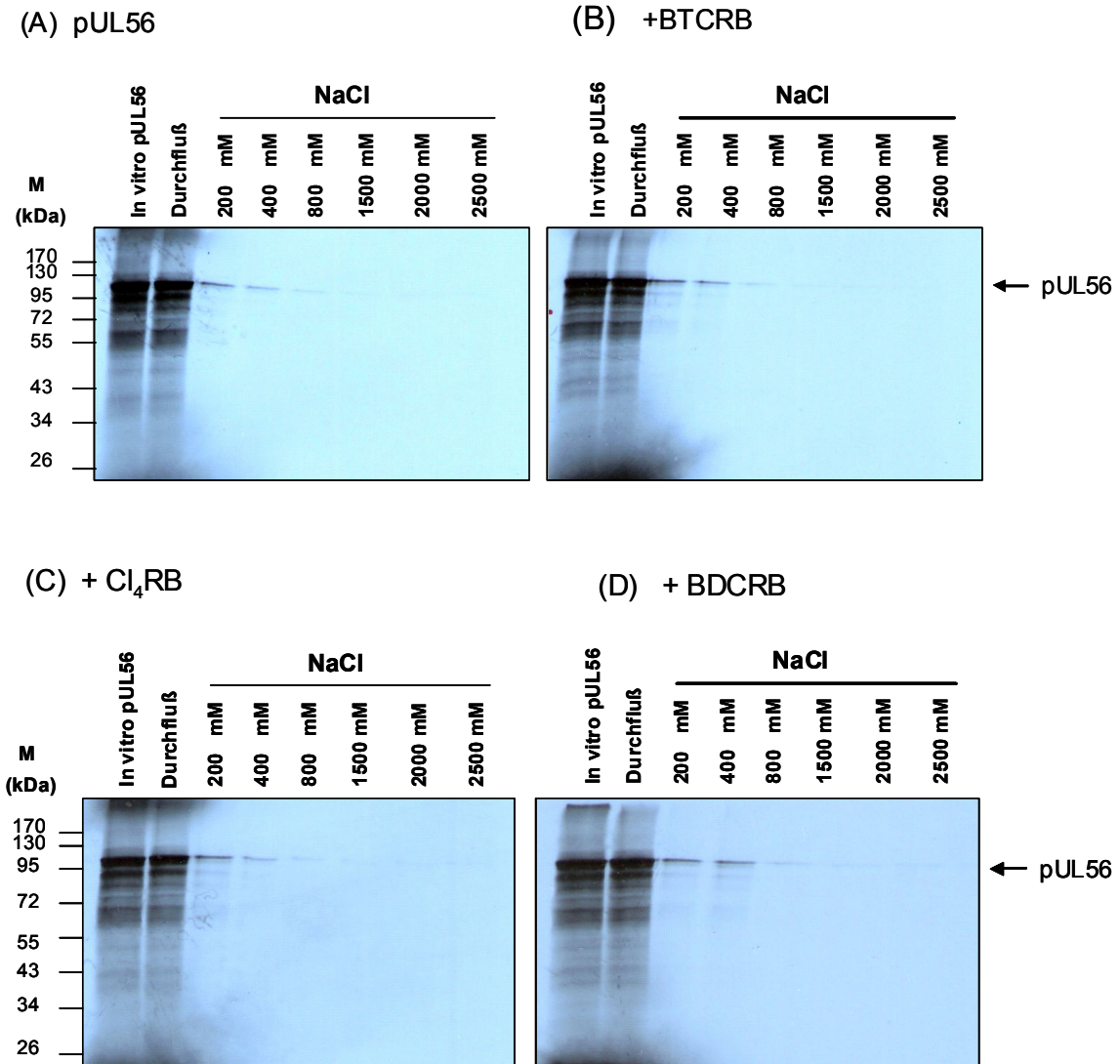
HFF-Zellen wurden mit HCMV AD169 (MOI 0,01) infiziert. Die Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (0, 6, 24, 48, 72, 96 h p.i.) in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Nach einer Infektionszeit von 7 Tagen wurde die infizierten Zellen mit Kristallviolett (0,2 % (w/v) in 20 % EtOH) gefärbt. Danach wurde der inhibitorische Effekt über die Anzahl der Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie bestimmt.

### 5.2.3 Einfluss von Benzimidazol D-Ribonukleosiden auf die pUL56 assoziierte DNA-Bindung

Um nachzuweisen, ob die Substanzen einen inhibitorischen Effekt auf die DNA-Bindung von pUL56 ausüben, sollte eine *in vitro*-Translation des Proteins mit radioaktiv markierten [<sup>35</sup>S]-Methionin in Anwesenheit der Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) durchgeführt werden. Als Positivkontrolle wurde hier ein

Translationsansatz ohne Substanzen verwendet. Die Translationsprodukte wurden auf dsDNA-Zellulose gegeben und gebundenes Protein schrittweise mit steigenden Salzkonzentrationen eluiert. Der Proteingehalt der Eluat-Fractionen wurde auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbt, entfärbt und getrocknet. Anschließend wurden die Banden mittels Autoradiographie detektiert.

In der unbehandelten Kontrolle sieht man, dass pUL56 ab einer Konzentration von 200 mM NaCl von der Säule eluiert werden konnte. Dies zeigt, dass wie bereits bekannt pUL56 an DNA bindet (Abb. 5.6 (A)). Allerdings war die größte Menge der Proteine im Durchfluss vorhanden. Interessanterweise wurde das Protein in Anwesenheit der Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) ebenfalls detektiert (Abb. 5.6: (B), (C), und (D)), so dass offenbar die DNA-Bindungsfähigkeit bei einer Behandlung mit den Substanzen nicht verloren geht.



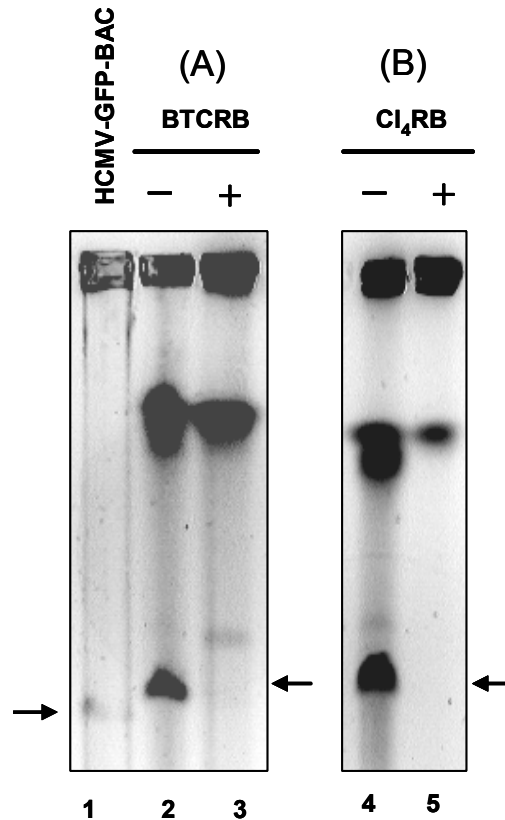
**Abb. 5.6: *In vitro*-Analyse der DNA-Bindung von pUL56 in An- und Abwesenheit der Substanzen**

Eine dsDNA-Zellulose-Säule wurde mit *in vitro* translatiertem pUL56 (*in vitro* pUL56) in Ab- **(A)** und Anwesenheit der Substanzen **(B, C, D)** beladen. Die Proteine wurden schrittweise mit steigendem Salzgradienten eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbt, entfärbt und getrocknet. Anschließend wurde eine Autoradiographie durchgeführt.

#### **5.2.4 Einfluss der Benzimidazol D-Ribonukleosid-Behandlung auf die DNA-Prozessierung**

Um nachzuweisen, ob die untersuchten Substanzen die Spaltung konkatermerer DNA in Genomeinheiten inhibieren, sollte die intrazelluläre virale DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Dazu wurden HFF-Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und mit HCMV AD169 (MOI 1) infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen mit 30 µM BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB behandelt und anschließend für weitere 96 h inkubiert. Unbehandelte infizierte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach einer Infektionszeit von 96 h wurden die Zellen geerntet und in Agaroseblöcke eingebettet. Die Zellyse erfolgte in diesen Agaroseblöcken. Nach einem Gelllauf von 20 h wurde das Agarosegel mit Ethidumbromid gefärbt und fotografiert.

Um die Position der monomeren viralen DNA nachweisen zu können, wurde hier das Bacmid HCMV-GFP-BAC-ΔUL89 als ein Größenmarker (Thoma et al., 2006) verwendet, dies das vollständige HCMV-Genom (ca. 239 kbp) enthält (Abb. 5.7.1, Spur 1). Bei den unbehandelten infizierten Zellen ist deutlich zu sehen, dass die konkatermere DNA in Genomeinheiten gespalten wurde (Abb. 5.7.1, Spur 2 und 4). Dagegen konnte die Spaltung in Genomeinheiten bei mit BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB behandelten infizierten Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 5.7.1, Spur 3 und 5). Infolgedessen haben sowohl BTCRB als auch Cl<sub>4</sub>RB einen inhibitorischen Effekt auf die Spaltung der konkatermeren DNA in Genomeinheiten.



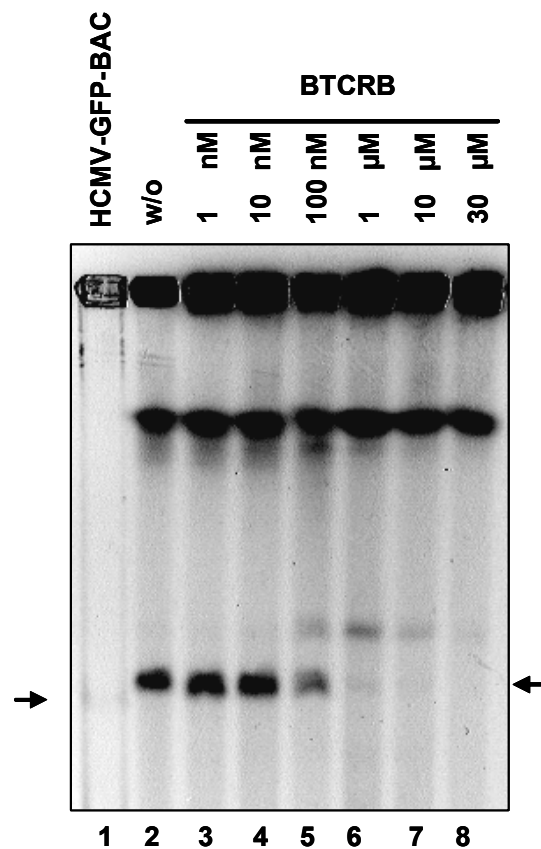
**Abb. 5.7.1: Einfluss von BTCRB bzw. Cl<sub>4</sub>RB auf die Spaltung von konkatemere DNA**

HFF-Zellen wurden mit HCMV AD169 (MOI 1) in Ab- bzw. in Anwesenheit von 30  $\mu$ M BTCRB (A) und Cl<sub>4</sub>RB (B) infiziert. Nach 96 h p.i. wurden die Zellen geerntet und in Agroseblöcken lysiert. Die intrazelluläre DNA wurde mittels PFGE aufgetrennt. Danach wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

Um nachzuweisen, in welcher Konzentration die Inhibition der DNA-Spaltung optimal ist, wurde HCMV infizierte Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von BTCRB behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der Spaltung konkatemerer DNA mittels PFGE.

Interessanterweise zeigte sich, dass die Inhibition der Spaltung in Genomeinheiten ab BTCRB Konzentration von 100 nM erfolgte. Bei dieser Konzentration konnten noch geringere Menge der Spaltungsprodukte detektiert werden (Abb. 5.7.2, Spur 5). Je höher die eingesetzte Konzentration von BTCRB war, desto deutlicher wurde die Spaltung der konkatemerer DNA inhibiert (Abb. 5.7.2 Spur 6 - 8). Im Gegensatz dazu war bei niedrigen Konzentrationen von BTCRB bzw. unbehandelten infizierten Zellen deutlich zu erkennen, dass die Spaltung konkatemerer DNA in Genomeinheiten erfolgte (Abb. 5.7.2, Spur 2 - 4). Somit zeigte sich, dass die

Inhibition der Spaltung der konkatemeren DNA ab einer Konzentration von 100 nM BTCRB erfolgte.



**Abb. 5.7.2: PFGE-Analyse mit verschiedenen Konzentrationen von BTCRB**

HFF Zellen wurden mit HCMV AD169 (MOI=1) infiziert. Nach der Infektion wurden verschiedene Konzentrationen von BTCRB eingesetzt und anschließend bis zu 96 h inkubiert. Die unbehandelten infizierten Zellen wurden hier als Positivkontrolle verwendet. Nach 96 h p.i. wurden die Zellen geerntet und in Agaroseblöcken lysiert. Nach der Lyse wurde die PFGE durchgeführt. Danach wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

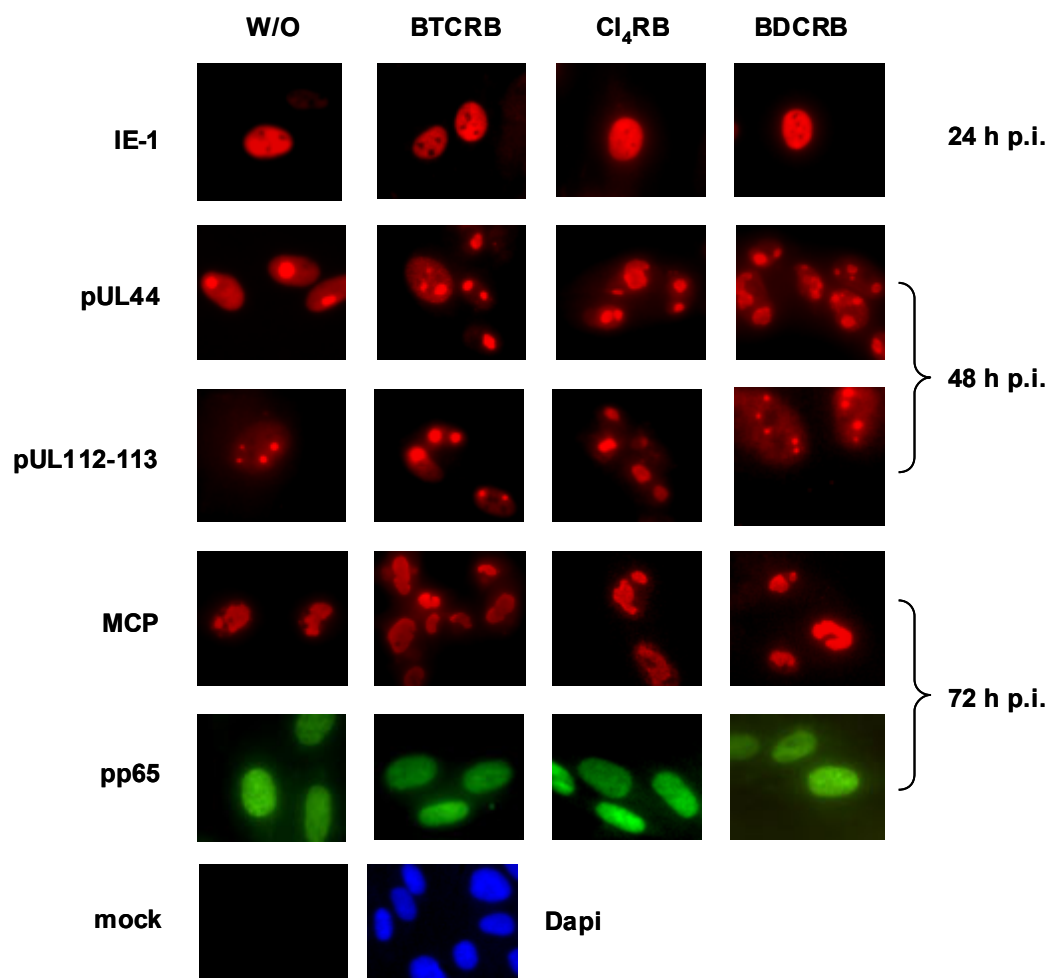
### 5.2.5 Einfluss auf die Expression von viralen Proteinen

Um eine eventuell veränderte Lokalisation und verminderte Expression von sehr frühen, frühen und späten Proteinen nachzuweisen, wurden HFF-Zellen mit HCMV AD169 (MOI 1) in Ab- bzw. Anwesenheit von 10 µM BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB bzw. BDCRB infiziert. Nach 72 h p.i. wurde die Proteinexpression im Verlauf der Infektion mittels Immunfluoreszenz analysiert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen.

Nach einer Infektionszeit von 24 h wurde keine Veränderung der intrazellulären Lokalisation und der Menge des gebildeten Proteins IE-1 beobachtet. Das



intrazelluläre Signal war in Anwesenheit der Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB), bzw. unbehandelten infizierten Zellen (w/o) vergleichbar (Abb. 5.8 Reihe: 24 h p.i.). Als frühe Proteine diente der Nachweis gegen pUL44, sowie pUL112-113. Beide Proteine befanden sich in Replikationszentren wie erwartet (Abb. 5.8 Reihe: 48 h p.i.). Darüber hinaus wurde die Expression von dem Hauptkapsid-Protein MCP (spät) als auch von dem Tegument-Protein pp65 (früh/spät) nicht inhibiert (Abb. 5.8 Reihe: 72 h p.i.). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Substanzen keinen inhibitorischen Effekt auf die Expression sowie auf die intrazelluläre Lokalisation besitzen.



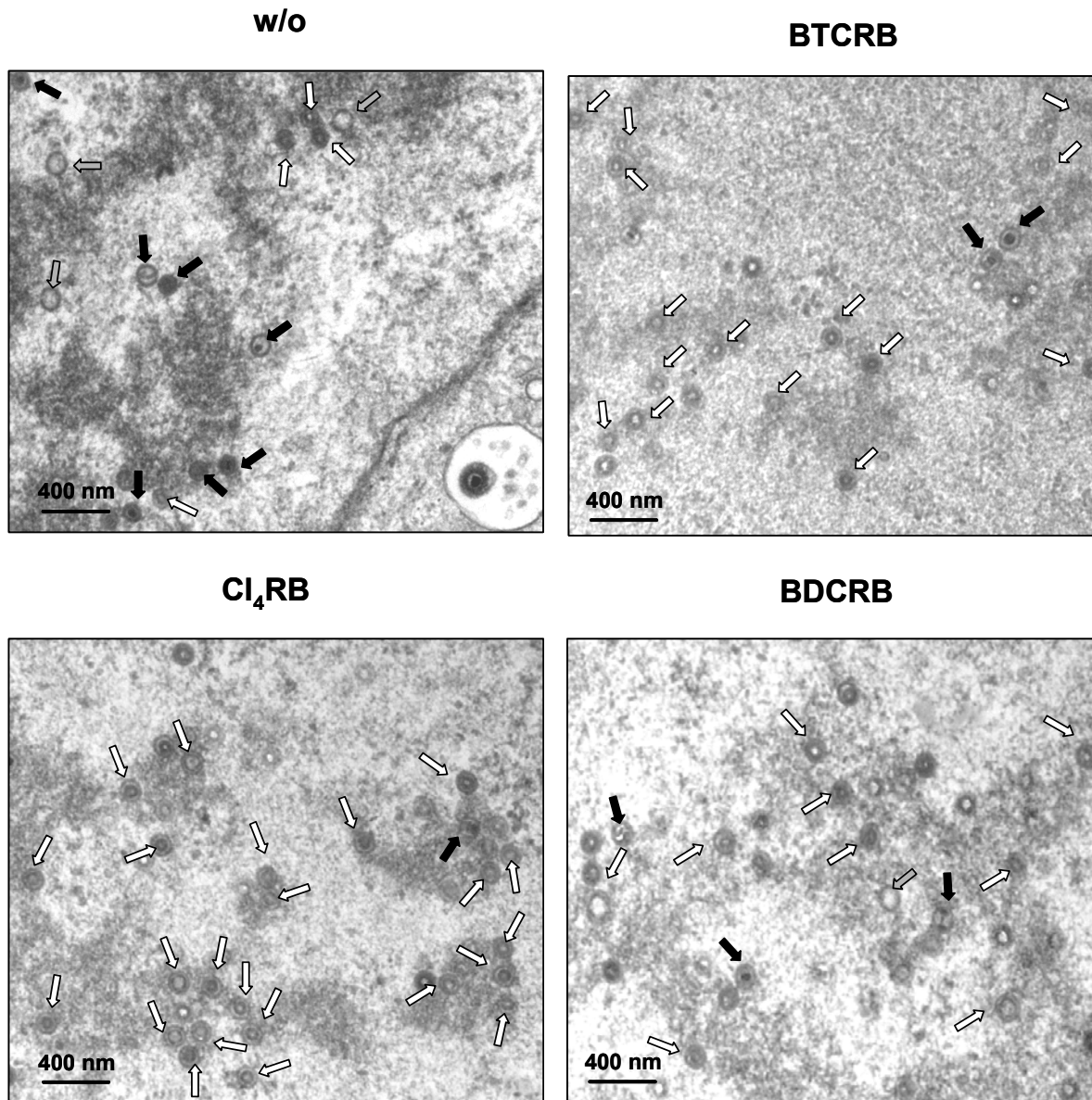
**Abb. 5.8: Einfluss von Substanzen auf die Expression und intrazelluläre Lokalisation von viralen Proteinen im Verlauf der Infektion**

HFF-Zellen wurden mit HCMV AD169 (MOI 1) in Ab- (w/o) oder Anwesenheit von 10 µM BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB infiziert. Nach einer Infektionszeit von 24 (Reihe: 24 h p. i.), 48 (Reihe: 48 h p.i.) oder 72 h (Reihe: 72 h p.i.) wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und eine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen IE-1, pUL44, pUL112-113, MCP und pp65 durchgeführt.

### **5.2.6 Einfluss auf die DNA-Verpackung und die Bildung infektiöser Partikel**

Um nachzuweisen, ob unter dem Einfluss der getesteten Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) Viruspartikel oder virale Kapside gebildet werden, wurden elektronenmikroskopische Analysen von behandelten und unbehandelten Zellen durchgeführt. HFF-Zellen wurden bis zur Konfluenz in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen angezüchtet und anschließend mit HCMV AD169 (MOI 1) in Ab- (w/o) oder Anwesenheit von 5 µM BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB infiziert. Nach 96 h p.i. wurden die Zellen mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit Osmiumtetroxid und die Einbettung in Epon. Die mit einem Ultramikrotom angefertigten Ultradünnschnitte wurden auf Kupfer-Netzchen übertragen und mit Uranylacetat sowie Bleiacetat gefärbt. Die Analyse erfolgte mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop. (Tecnai™ G2). Die Images wurde mit einer 2K Digitalkamera MegaView III (Olympus) fotografiert.

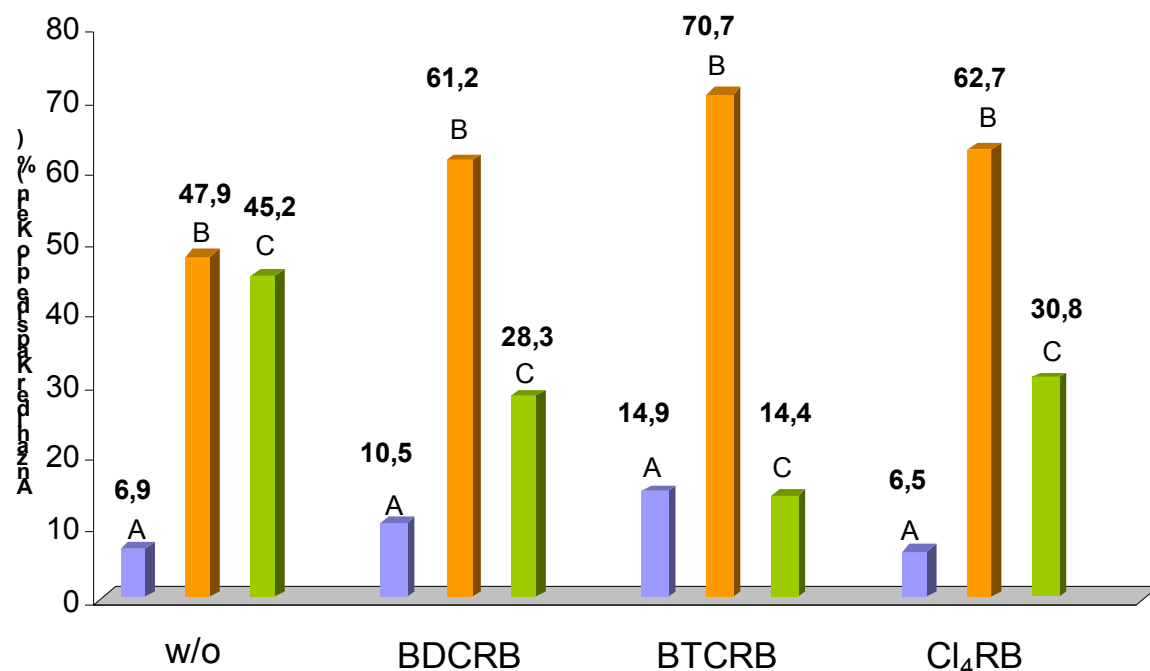
In unbehandelten infizierten HFF-Zellen konnten deutlich A-, B- und C-Kapside im Zellkern als auch Virionen im Cytoplasma beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde nach der Behandlung mit BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB überwiegend B-Kapside im Zellkern detektiert. In Anwesenheit der Substanzen ist die DNA-Verpackung blockiert, so dass keine replikativen Strukturen im Kern gebildet werden (Abb. 5.9.1). In der Quantifizierung ist zu erkennen, dass die Anzahl der B-Kapside in Anwesenheit von BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB oder BDCRB erhöht, während die Anzahl der C-Kapside reduziert war (Abb. 5.9.2; Tabelle 5.3).



**Abb. 5.9.1: Elektronenmikroskopische Analyse infizierter HFF-Zellen in Ab- (w/o) oder Anwesenheit von BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB**

HFF-Zellen wurden bis zur Konfluenz in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen angezüchtet und anschließend mit HCMV AD169 (MOI 1) in Ab- (w/o) oder Anwesenheit von 5 µM BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB infiziert. 96 h nach der Infektion wurden die Zellen mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit Osmiumtetroxid und Einbettung in Epon.

B-Kapside sind mit weißen Pfeilen, A-Kapside mit grauen Pfeilen und C-Kapside mit schwarzen Pfeilen markiert.



**Abb. 5.9.2: Quantifizierung von Kapsiden pro Kern in infizierten Zellen in Ab- oder Anwesenheit von BDCRB, Cl<sub>4</sub>RB bzw. BDCRB**

**Tabelle 5.3: Anzahl der Kapside pro Kern in infizierten Zellen in An- oder Abwesenheit der Substanzen**

Zellen	gezählte Kerne	A-Kapside (%)	B-Kapside (%)	C-Kapside (%)
AD169	5	21 (6,9)	145 (47,9)	137 (45,2)
AD 169+BTCRB	13	30 (14,9)	142 (70,7)	29 (14,4)
AD 169+Cl <sub>4</sub> RB	11	10 (6,5)	96 (62,7)	47 (30,8)
AD 169+BDCRB	9	7 (10,5)	41 (61,2)	19 (28,3)

### 5.3 Wirkung der Benzimidazol D-Ribonukleoside auf klinische HCMV-Isolate

Um nachzuweisen, ob die Substanzen einen Effekt auf klinische HCMV-Isolate zeigen, wurden Virusisolate, die aus HCMV-positiven Patientenseren isoliert wurden, verwendet. Die bisherigen Versuche wurden mit dem Laborstamm HCMV AD169 durchgeführt. Dieser Stamm hat aufgrund häufiger Passagen in der Zellkultur einige

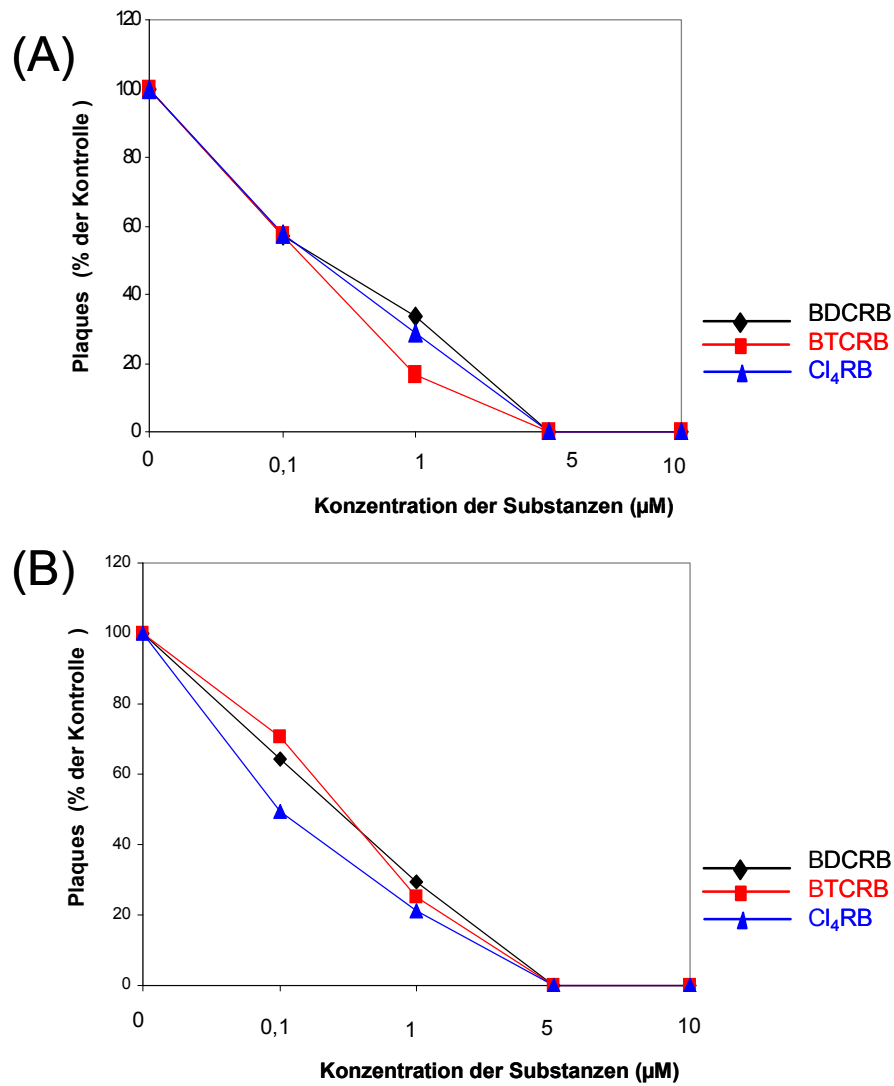
Genprodukte und damit seine Infektiosität verloren. Infolgedessen ist eine zuverlässige Vorhersage bezüglich des Nutzens für die spätere therapeutische Anwendung nicht möglich. In den nachfolgenden Experimenten wurde Virusisolate, die nur kurz in Zellkultur passagiert wurden, verwendet. Im Folgenden wurde die antivirale Aktivität der Substanzen, die Replikationskinetik der viralen Freisetzung, der Einfluss auf die Spaltung der konkatemeren DNA und der DNA-Verpackung analysiert.

### **5.3.1 Antivirale Aktivität der Substanzen auf klinische HCMV-Isolate**

Um die antivirale Aktivität der Substanzen auf HCMV Isolaten nachzuweisen, wurde ein Plaque-Reduktions Test mittels unterschiedlichen HCMV-Isolaten durchgeführt. Zunächst wurden HFF-Zellen mit GCV-sensitiven (K. Korn, Erlangen) bzw. GCV-resistenten HCMV-Isolaten (K. Hamprecht, Tübingen) (MOI 0,01) infiziert. Nach Infektion wurden die Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und anschließend mit Methylzellulose überschichtet. Nach ca. 8 Tagen wurde der inhibitorische Effekt der Substanzen über die Anzahl der ausgebildeten Plaque mit Hilfe von Lichtmikroskopie ausgewertet, wobei stets Doppelbestimmungen erfolgten. Indem die Anzahl der Plaques der infizierten Zellen ohne Inhibitor auf 100% gesetzt wurde, erhielt man darauf bezogen die Werte der Reduktion.

Es zeigte sich, dass alle Substanzen sowohl gegen GCV-sensitive als auch GCV-resistente HCMV-Isolate wirksam sind, da eine deutliche Reduktion der Plaques auftrat (Abb. 5.10 (A) und (B)). Der IC<sub>50</sub>-Wert der GCV-sensitiven HCMV-Isolate war effektiver als im Fall der GCV-resistenten HCMV-Isolate (Tabelle 5.4).

Interessanterweise zeigte Cl<sub>4</sub>RB einen niedrigeren IC<sub>50</sub>-Wert von 0,15 µM bei einer Infektion mit GCV-resistenten HCMV-Isolaten, wohingegen BTCRB und BDCRB einen IC<sub>50</sub>-Wert von etwa 0,50 µM aufwiesen. Während der IC<sub>50</sub>-Wert von BTCRB bei der GCV-sensitiven HCMV-Isolaten bei 0,23 µM lag, zeigten Cl<sub>4</sub>RB mit 0,33 µM und BDCRB mit 0,35 µM einen höheren Wert (Tabelle 5.4).



**Abb. 5.10: Antivirale Aktivität der Substanzen auf HCMV-Isolaten**

Humane Fibroblasten wurden in Ab- oder in Anwesenheit von Substanzen mit GCV-sensitiven-(A) bzw. GCV-resistenten klinischen HCMV-Isolaten (B) (MOI 0,01) infiziert. Nach 8 Tagen wurden die infizierten Zellen mit Kristallviolett (0,2 % (w/v) in 20 % EtOH) gefärbt. Die inhibitorische Wirkung wurde über die Anzahl der Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie ausgewertet.

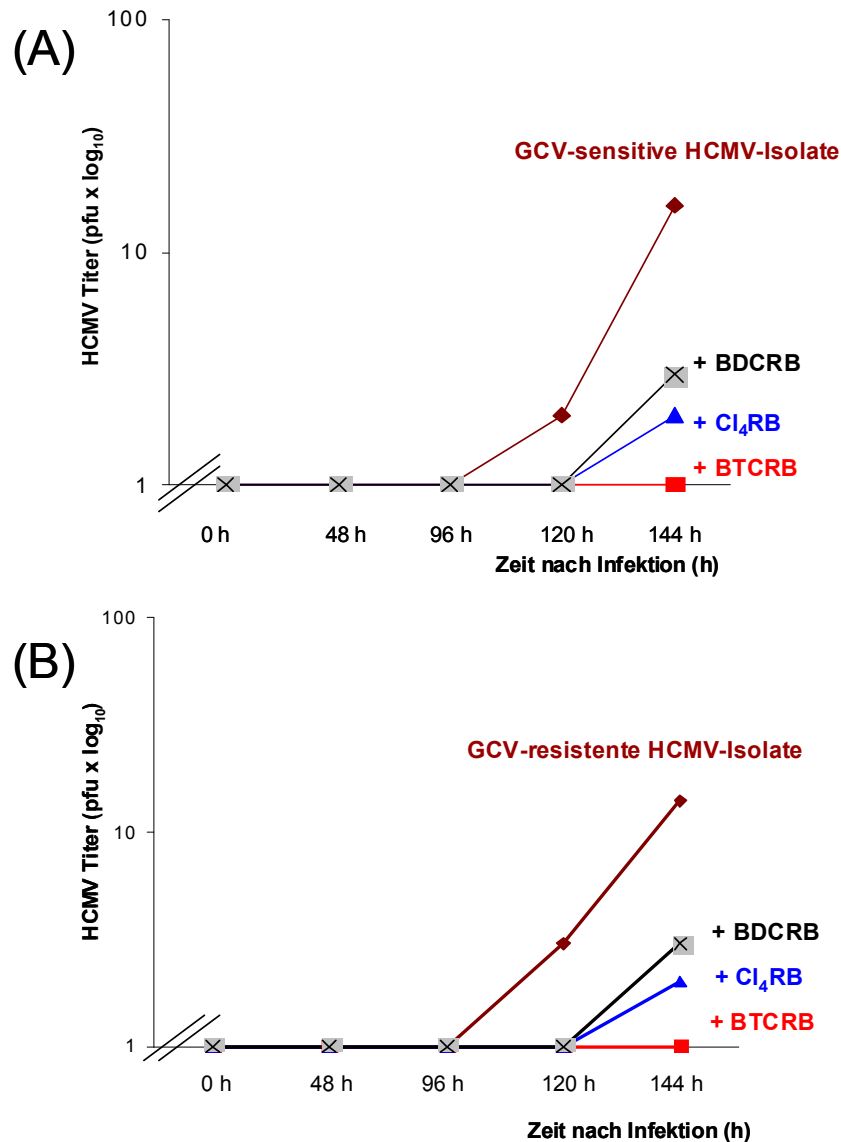
**Tabelle 5.4: IC<sub>50</sub>-Wert der Substanzen**

Substanz	GCV-sensitives HCMV-Isolat IC <sub>50</sub> -Wert (µM)	GCV-resistentes HCMV-Isolat IC <sub>50</sub> -Wert (µM)
BTCTB	0,23±0,11	0,50±0,70
Cl <sub>4</sub> RB	0,33±0,20	0,15±0,07
BDCRB	0,35±0,19	0,47±0,95

### 5.3.2 Einfluss der Inhibitoren auf die Freisetzung von Virionen

Um den Einfluss der Substanzen auf die Freisetzung von Virionen in mit HCMV-Isolaten infizierten Zellen nachzuweisen, wurden HFF-Zellen mit GCV-sensitiven- bzw. GCV-resistenten HCMV-Isolaten (MOI 1) in Ab- bzw. Anwesenheit von 10 µM BDCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB infiziert. Der Zellkulturüberstand (Zeitraum von 24 bis 144 Stunden) wurde gesammelt und anschließend bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde der virushaltige Zellkulturüberstand wiederum auf neue HFF-Zellen gegeben und bei 37 °C 1,5 h inkubiert. Nach Infektion wurde das Inokulum abgenommen und anschließend mit Methylzellulose überschichtet. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Inhibitoren. Nach 8 Tagen wurde die Anzahl der Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie ausgezählt.

Es zeigte sich eine deutliche Differenz zu unbehandelten Zellen bezüglich der Freisetzung von infektiösen Partikeln (Abb. 5.11 (A) und (B)). Die Bildung der Tochtervirionen in Anwesenheit der Substanzen wurde bis zu einen Zeitpunkt von 120 h p.i. unterdrückt, wohingegen sich zu einen späteren Zeitpunkt Unterschiede in Abhängigkeit von der jeweiligen Substanz zeigten. Hierbei war die Wirksamkeit von BDCRB auf beiden HCMV-Isolaten am effektivsten, wohingegen BDCRB eine schwache Inhibition aufwies (Abb. 5.11 (A) und (B)).



**Abb. 5.11: Wachstumskurve für die virale Freisetzung**

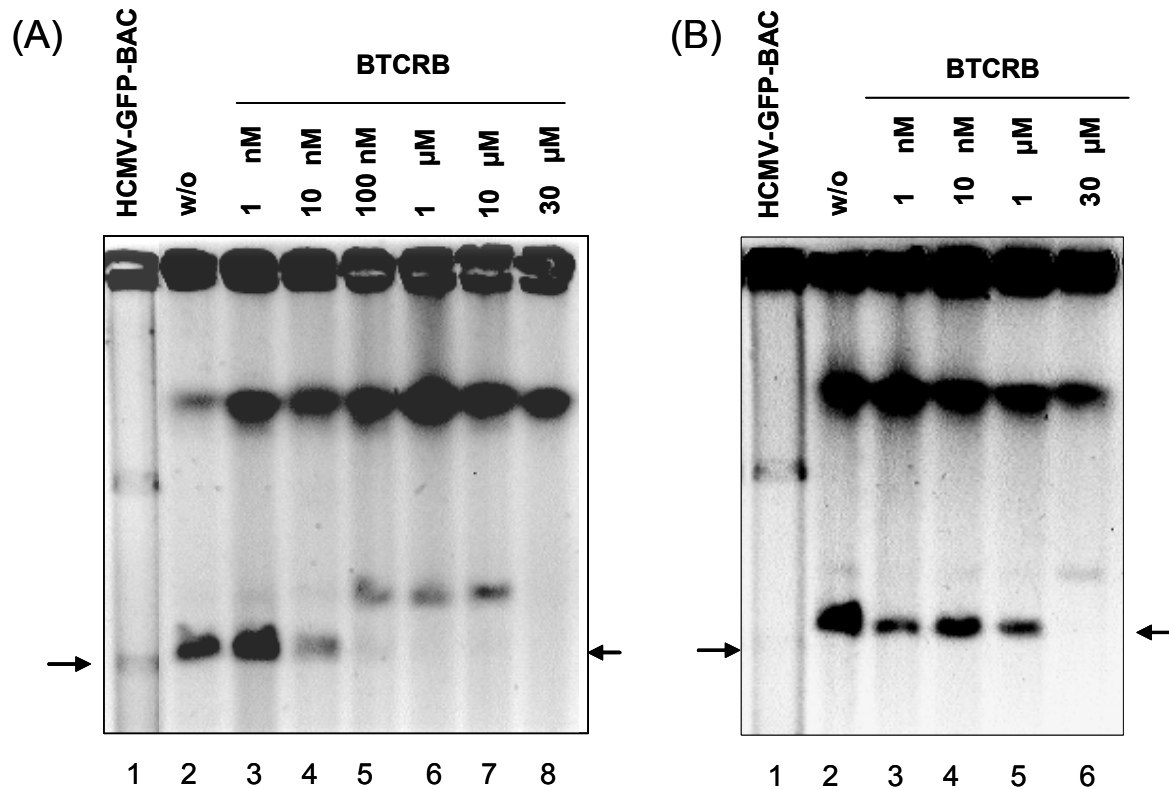
HFF-Zellen wurden mit GCV-sensitiven (A) bzw. GCV-resistenten HCMV-Isolaten (B) in Ab- oder Anwesenheit der Substanzen in einer Konzentration von 10  $\mu$ M infiziert. Der Zellkulturüberstand (24 h – 144 h p.i.) wurde abgenommen und auf neue HFF-Zellen gegeben. Nach 8 Tagen wurde die inhibitorische Wirkung in der Zellkultur über die Anzahl der gebildeten Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie ausgewertet.



### **5.3.3 Einfluss auf die Spaltung konkatermerer DNA in mit HCMV Isolaten infizierten Zellen**

Um den Einfluss auf die Spaltung konkatermerer DNA in Genomeinheiten in mit HCMV-Isolaten infizierten Zellen nachzuweisen, wurde die intrazelluläre DNA mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese analysiert. HFF-Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und mit GCV-sensitiven bzw. GCV-resistenten HCMV-Isolaten (MOI 1) infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von BTCRB behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte infizierte Zellen mitgeführt. Nach einer Infektionszeit von 96 h wurden die Zellen geerntet und in Agaroseblöcke eingebettet. Die Zellyse erfolgte in diesen Agaroseblöcken. Nach einem Gellauf von 20 h wurde das Agarosegel mit Ethidumbromid gefärbt und fotografiert.

Um die Position der monomeren viralen DNA nachweisen zu können, wurde wiederum das Bacmid HCMV-GFP-BAC- $\Delta$ UL89 als ein Größenmarker (Thoma et al., 2006) verwendet (Abb. 5.12, (A) und (B) Spur 1). Bei den behandelten infizierten Zellen ist deutlich zu sehen, dass die konkatermere DNA in Genomeinheiten gespalten wurde (Abb. 5.12, (A) und (B) Spur 2). Dagegen konnte die DNA Spaltung in Gegenwart von BTCRB inhibiert werden (Abb. 5.12, (A) Spur 5 – 8 und (B) Spur 6). Je höher die Konzentration von BTCRB war, desto deutlicher wurde die Spaltung der konkatermeren DNA inhibiert. Während im Fall von mit GCV-sensitiven HCMV-Isolaten infizierten Zellen die Inhibition der Spaltung der konkatermeren DNA ab einer Konzentration von 100 nM BTCRB beobachtet werden konnte, war im Fall von GCV-resistenten Isolaten Konzentration von 30  $\mu$ M BTCRB notwendig (Abb. 5.12, (A) Spur 5 und (B) Spur 6). Diese Ergebnisse zeigten, dass BTCRB in mit GCV-sensitiven HCMV-Isolaten infizierten Zellen effektiv ist.



**Abb. 5.12: PFGE-Analyse mit verschiedenen Konzentrationen von BTCRB**

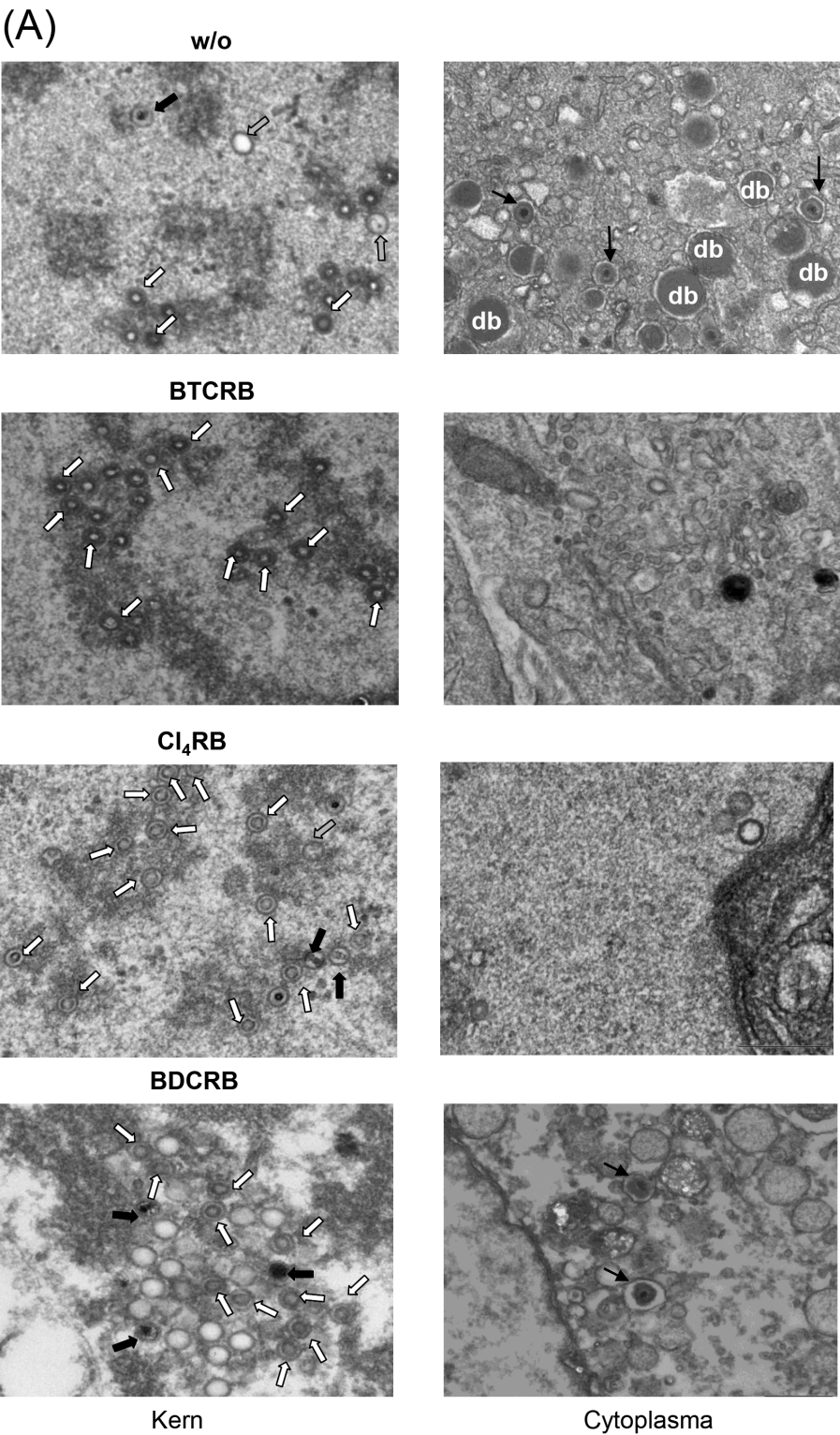
HFF Zellen wurden mit GCV-sensitiven (A) bzw. GCV-resistenten HCMV Isolaten (B) (MOI 1) infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von BTCRB behandelt und anschließend bis zu 96 h inkubiert. Die unbehandelten infizierten Zellen wurden hier als Positivkontrolle verwendet. Nach 96 h p.i. wurden die Zellen geerntet und in Agaroseblöcken lysiert. Nach der Lyse wurde die PFGE durchgeführt. Anschließend wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

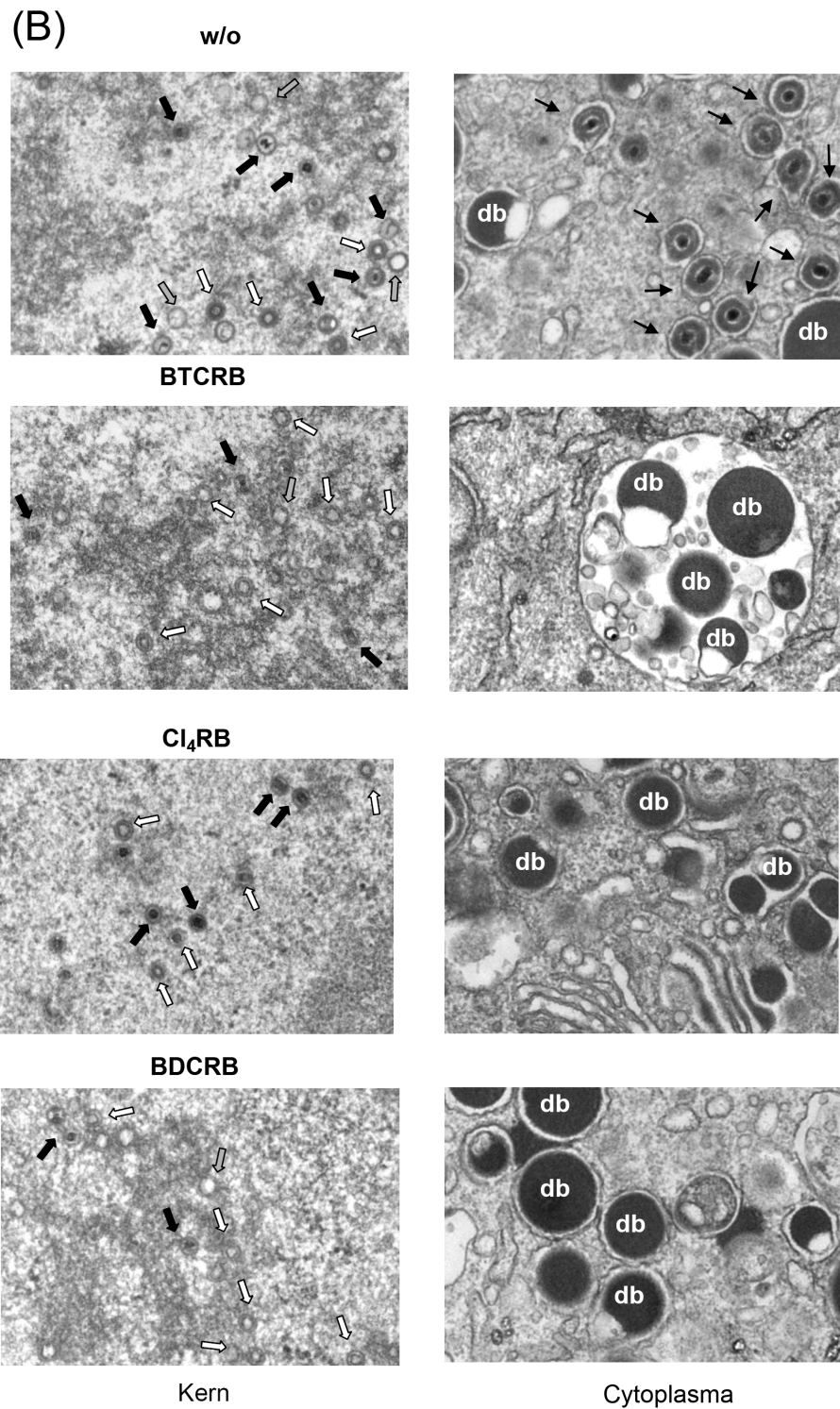
### 5.3.4 Einfluss auf die DNA-Verpackung und die Bildung infektiöser Partikel

Um die Auswirkung der Substanzen auf die Bildung infektiöser Partikel in mit HCMV-Isolaten infizierten Zellen zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Analysen mit behandelten und unbehandelten Zellen durchgeführt. HFF-Zellen wurden bis zur Konfluenz in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen angezüchtet und anschließend mit GCV-sensitiven bzw. GCV-resistenten HCMV-Isolaten (MOI 1) in Abwesenheit (w/o) oder Anwesenheit von 10 μM BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB infiziert. Nach ca. 120 h p.i. wurden die Zellen mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit Osmiumtetroxid und die Einbettung in Epon. Die mit einem

Ultramikrotom angefertigten Schnitte wurden auf Kupfer-Netzchen übertragen und mit Uranylacetat sowie Bleiacetat gefärbt. Die Analyse erfolgte mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (Tecnai™ G2) und einer 2K Digitalkamera MegaView III (Olympus).

Bei unbehandelten mit HCMV-Isolaten infizierten HFF-Zellen waren A-, B- und C-Kapside im Zellkern sowie Virionen und dense bodies im Cytoplasma sichtbar (Abb. 5.13 (A) und (B)). Im Gegensatz dazu wurde nach der Behandlung mit BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB überwiegend B-Kapside im Zellkern als auch nicht-infektöse dense bodies im Cytoplasma detektiert. Interessanterweise wurden überwiegend Prokapside im Fall von BDCRB behandelten infizierten Zellen beobachtet (Abb. 5.13 (A)). In Anwesenheit der Substanzen wurde die DNA-Verpackung inhibiert, so dass keine replikativen Strukturen z.B. B-Kapside bzw. Prokapside im Kern ausgebildet wurden. Mittels Quantifizierung konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der B-Kapside nach der Behandlung mit BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB oder BDCRB erhöht wurde (Abb. 5.14; Tabelle 5.5). Allerdings war die Anzahl von C-Kapsiden nur geringfügig im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduziert.



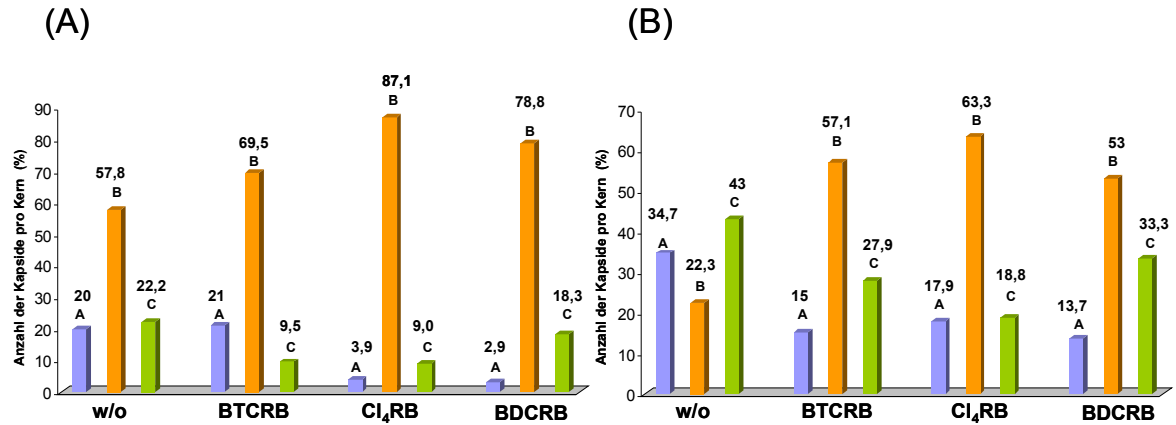


**Abb. 5.13 : Elektronenmikroskopische Aufnahme der mit HCMV-Isolaten infizierten HFF-Zellen in Ab- (w/o) oder Anwesenheit von BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB**

HFF-Zellen wurden bis zur Konfluenz in 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen angezüchtet und anschließend mit GCV-sensitiven (A) oder GCV-resistenten HCMV-Isolaten (B) (MOI=1) in Ab- (w/o) oder Anwesenheit von BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB infiziert. Nach 96 h p.i. wurden die Zellen mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert, mit Osmiumtetroxid gefärbt und in Epon eingebettet.

## Ergebnisse

B-Kapside sind mit weißen Pfeilen, A-Kapside mit grauen Pfeilen, C-Kapside mit schwarzen Pfeilen und Virionen mit dünnen schwarzen Pfeilen gekennzeichnet (db=dense bodies).



**Abb. 5.14: Quantifizierung von Kapsiden pro Kern in mit HCMV-Isolaten infizierten Zellen in Ab- oder Anwesenheit von BTCRB, CI<sub>4</sub>RB und BDCRB**

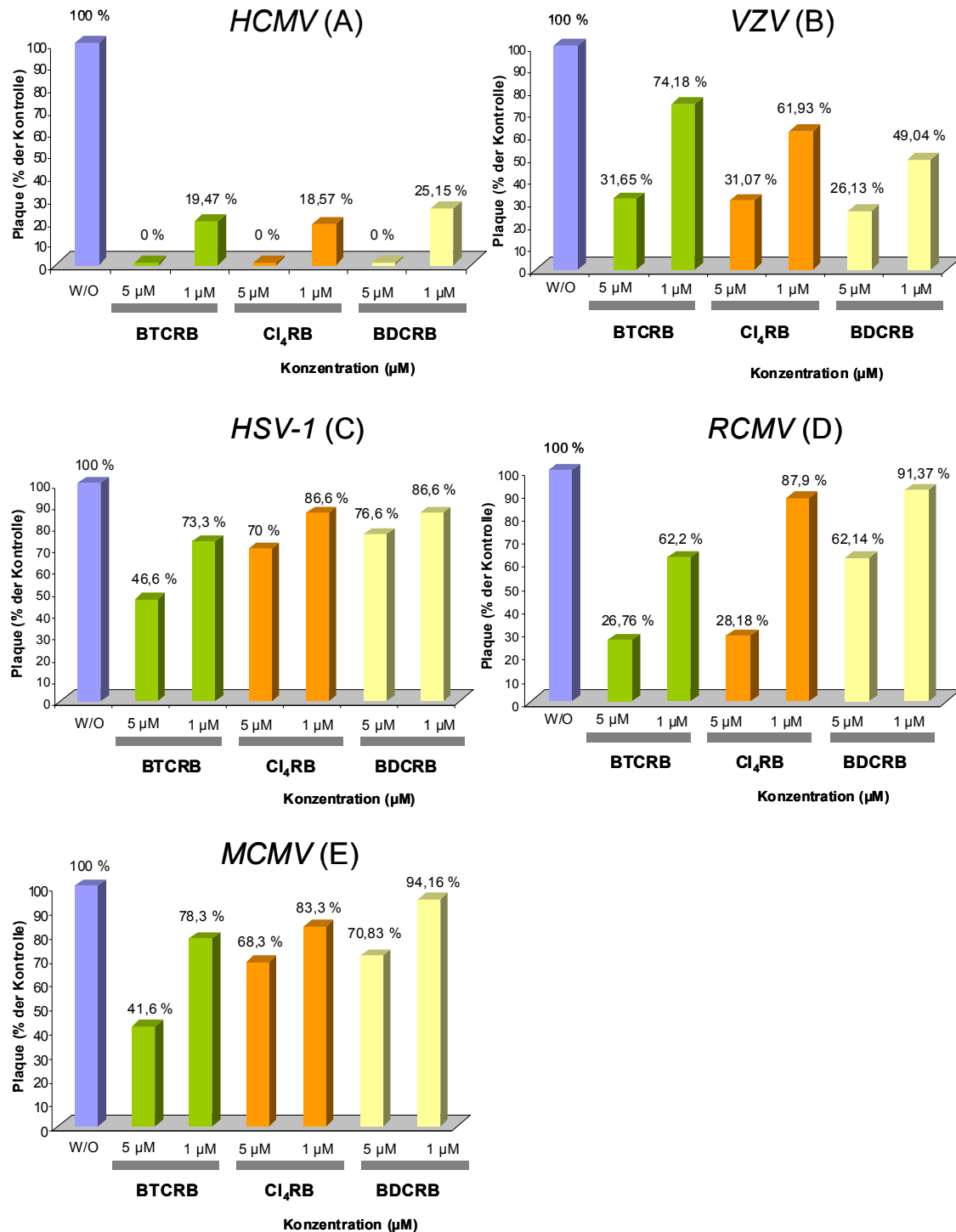
**Tabelle 5.5: Anzahl der Kapside pro Kern in infizierten Zellen in An- oder Abwesenheit der Substanzen**

Zellen	gezählte Kerne	A-Kapside (%)	B-Kapside (%)	C-Kapside (%)
<b>GCV-sensitive HCMV-Isolate (A)</b>	5	9 (20)	26 (57,8)	10 (22,2)
(A) +BTCRB	7	22 (21)	73 (69,5)	10 (9,5)
(A) +CI <sub>4</sub> RB	9	9 (3,9)	203 (87,1)	21 (9)
(A) +BDCRB	9	3 (2,9)	82 (78,8)	19 (18,3)
<b>GCV-resistente HCMV-Isolate (B)</b>	6	67 (34,7)	43 (22,3)	86 (43)
(B) +BTCRB	9	21 (15)	80 (57,1)	39 (27,9)
(B) +CI <sub>4</sub> RB	6	37 (17,9)	131 (63,3)	39 (18,8)
(B) +BDCRB	10	39 (13,7)	151 (53)	95 (33,3)

## **5.4 Wirkung neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside auf andere Herpesviren**

Um nachzuweisen, ob die Substanzen (BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB) neben HCMV einen Effekt auf weitere Herpesviren haben, wurden Plaques Reduktions-Test mit Varicella-Zoster-Virus (VZV), Maus-Cytomegalovirus (MCMV), Ratten-Cytomegalovirus (RCMV) und Herpes-simplex-Virus Typ-1 (HSV-1) durchgeführt. Hierfür wurden verschiedenen Zelllinien (Fi301-Zellen, Rattenzellen, NIH-373 Zellen, HFF-Zellen) in 12-well-Kulturplatten bis zu Konfluenz kultiviert und mit HSV-1, MCMV, RCMV und VZV (MOI 0,01) in Ab- oder Anwesenheit von BTCRB, Cl<sub>4</sub>RB und BDCRB in einer Konzentration von 5 µM bzw. 1 µM infiziert. Nach ca. 8 Tagen wurde der inhibitorische Effekt in Zellkultur über die Anzahl der gebildeten Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie ausgewertet. Um den inhibitorischen Effekt der Substanzen auf verschiedenen Herpesviren zu vergleichen, wurde HCMV als Kontrolle verwendet.

Im Gegenwart von 5 µM BTCRB erfolgte eine Reduktion die abhängig von dem jeweiligen Herpesvirus. Interessanterweise zeigte sich bei VZV eine Reduktion um 69 %, bei HSV-1 um  $\geq 55$  %, bei RCMV um  $\geq 74$  % und bei HCMV um  $\geq 100$  %. Im Gegensatz dazu hatte Cl<sub>4</sub>RB einen ähnlichen Effekt auf VZV ( $\geq 69$  %) und RCMV ( $\geq 72$  %) (Abb. 5.15). Diese Ergebnisse zeigten, dass BTCRB auf alle getesteten Herpesviren wirkt, aber sowohl BTCRB als auch Cl<sub>4</sub>RB eine vergleichbare Wirkung auf VZV und RCMV haben.



**Abb. 5.15: Wirkung von Benzimidazole D-Ribonukleosiden auf andere Herpesviren**

Die verschiedenen Zelllinien (Fi301-Zellen, Ratenzellen, 373-NIH-Zellen und HFF-Zellen) wurden mit unterschiedlichen Herpesviren (HCMV (A), VZV (B), HSV-1 (C), RCMV (D) und MCMV (E)) (MOI 0,01) in Ab- oder Anwesenheit von den Substanzen BTICRB, CI<sub>4</sub>RB und BDCRB in einer Konzentration von 5 µM bzw. 1 µM infiziert. Nach ca. 8 Tagen wurden die infizierten Zellen mit Kristallviolett ((0,2 % (w/v) in 20 % EtOH) gefärbt. Die inhibitorische Wirkung der Substanzen in Zellkultur wurde über die Anzahl der Plaques mit Hilfe von Lichtmikroskopie ausgewertet.



## 6. Diskussion

Das humane Cytomegalievirus (HCMV), eines von acht humanpathogenen Herpesviren, hat eine erhebliche medizinische Bedeutung. Bislang steht keine wirksame Immunprophylaxe zur Verfügung. Im Fall einer vorliegenden Infektion gibt es als therapeutische Mittel die Nukleosidanaloga Ganciclovir, Aciclovir, Valaciclovir, sowie das Nukleotidanalogen Cidofovir und schließlich das Pyrophosphatanalogon Foscarnet. Sie haben einen inhibitorischen Effekt auf die virale DNA-Synthese (DeClercq et al., 1993). Nachteile dieser Chemotherapeutika sind zum einen die erheblichen Nebenwirkung (Nephrotoxizität) und die geringe Bioverfügbarkeit. Zum anderen kommt es nach Anwendung der zur Verfügung stehenden Therapeutika häufig rasch zur Resistenzentwicklung. Infolgedessen wäre ein neuer Ansatz zur Entwicklung antiviraler Therapeutika die Hemmung der Verpackung viraler Nachkommen-DNA.

Die virale DNA-Verpackung und deren vorangehende Spaltung konkatemerer DNA sind wichtige und essentielle Schritte der Replikation von HCMV, in welchen die HCMV-Terminasenuntereinheiten pUL56 und pUL89 eine große Rolle spielen. Die große Untereinheit pUL56 bindet an Verpackungselemente der DNA (Bogner et al., 1993; Bogner et al., 1998; Bogner, 2002; Scheffczik et al., 2002) und stellt aufgrund seiner ATPase-Aktivität die Energie für die Translokation viraler DNA in das Prokapsid dar (Hwang und Bogner, 2002; Scholz et al., 2003), während die kleine Untereinheit pUL89 eine Nukleaseaktivität besitzt (Bogner, 1999; Scheffczik et al., 2002) und zur abschließenden Spaltung dient (Bogner et al., 1998; Bogner, 2002; Hwang und Bogner, 2002; Scheffczik et al., 2002; Scholz et al., 2003). Beide Proteine sind innerhalb der Herpesviren konserviert.

Die Benzimidazol D-Ribonukleoside BDCRB und TCRB, die durch L.B. Townsend (University of Ann Arbor, Michigan) synthetisiert wurden, sind als potentielle selektive Inhibitoren der HCMV Replikation bekannt. Tatsächlich hemmen sie die Spaltung konkatemerer DNA (Underwood et al., 1998). Die Benzimidazol D-Ribonukleoside BDCRB und TCRB führen zur Inhibition der HCMV-Terminase-Aktivität. (Krosky et al., 1998; Bogner, 2002; Scholz et al.,

2003; Savva et al., 2004). Bei BDCRB- und TCRB-resistenten Virusmutanten wurden Mutationen in den Genen UL56 und UL89 nachgewiesen (Krosky et al., 1998; Underwood et al., 1998).

Zwar zeigten die Benzimidazol D-Ribonukleoside eine spezifische inhibitorische Wirkung *in vitro* aber aufgrund der geringen metabolischen Stabilität *in vivo* (Chulay et al., 1999; Good et al., 1994; Drach et al., 2006) wurden sie nicht als antivirale Medikamente weiterentwickelt. Um die Stabilität *in vivo* zu verbessern, wurden weitere Benzimidazol D-Ribonukleosid Derivate synthetisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Benzimidazol D-Ribonukleosid Derivate, Acetylyester mit vier Halogenen, näher charakterisiert und anschließend ihre Wirkung auf die Replikation des humanpathogenen Cytomegalovirus analysiert.

### 6.1 Analyse neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside

Zunächst konnte die antivirale Aktivität der Substanzen mit Hilfe von Plaque Reduktions Test nachgewiesen werden, wobei die  $IC_{50}$ -Werte in mit HCMV AD169 infizierten Zellen bestimmt wurden. Alle Substanzen waren effektiv gegen den HCMV Laborstamm AD169, da sie zu einer Reduktion der Plaques führen (Abb. 5.1).  $Cl_4RB$  ist im Vergleich zu den anderen Substanzen BTCRB und BDCRB am wirksamsten, da diese Substanz aufgrund des  $IC_{50}$ -Werts von  $0,25 \mu M$  die Replikation effektiv verhindert. Interessanterweise weisen BTCRB und BDCRB ähnliche antivirale Aktivitäten auf, da die  $IC_{50}$ -Werte sich nur geringfügig unterscheiden (Tabelle 5.1). Interessanterweise wies das Isoschizomer Maribavir, ein Benzimidazol L-Ribonukleosid, einen vergleichbaren  $IC_{50}$ -Wert von  $0,54 \mu M$  gegen den Laborstamm AD169 auf (Biron et al., 2002), wohingegen GCV einen höheren  $IC_{50}$ -Wert von etwa  $6,3 \mu M$  hatte (Biron et al., 2002). Somit zeigen die neuen getesteten Benzimidazol D-Ribonukleosid Derivate BTCRB und  $Cl_4RB$  eine ähnliche Aktivität im Vergleich zu dem Benzimidazol L-Ribonukleosid Maribavir. Die Benzimidazol Derivate BTCRB und  $Cl_4RB$  zeigten eine antivirale Aktivität vergleichbar mit der Ursprungssubstanz BDCRB. Vermutlich können die unterschiedlichen  $IC_{50}$ -Werte auf differente Wirkungsmechanismen der Substanzen auf die virale DNA-Replikation zurückgeführt werden. Im Zytotoxizitäts-Test konnte gezeigt werden, dass BTCRB zwar einen niedrigen  $CC_{50}$ -Wert im Vergleich zu den anderen

Substanzen hat, der dennoch 50-fach über den  $IC_{50}$ -Wert liegt. Hingegen hat  $Cl_4RB$  aufgrund des Verhältnis von  $CC_{50}/IC_{50}$  über 260-fach eine höhere antivirale Aktivität (Tabelle 5.2).

Good et al. (1994) konnte bereits zeigen, dass BDCRB schnell metabolisiert wird. Infolgedessen wurden weitere Analysen mit den neuen Benzimidazol D-Ribonukleosid durchgeführt. Deshalb wurde die Stabilität der Substanzen *in vivo* getestet, um zu überprüfen, ob die Substanzen einen Vorteil für eine zukünftigen Verwendung als antivirales Therapeutikum haben. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass beide Acetylerster BDCRB und  $Cl_4RB$  aktiver als BDCRB bei einer Konzentration von 1  $\mu M$  waren (Abb. 5.3), wobei BDCRB die beste Stabilität *in vivo* aufwies. Infolgedessen müssen zukünftige Untersuchungen zeigen, welche Wirkung die Inhibitoren auf humane Plasmazellen haben.

## **6.2 Wirkung neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside auf die HCMV DNA-Replikation**

Um den Effekt der Substanzen auf die virale Replikation zu untersuchen, wurde eine Wachstumskurve bezüglich der Freisetzung von Virionen durchgeführt. Wie erwartet, erfolgte eine deutliche Differenz in der Freisetzung von Virionen im Vergleich zu unbehandelten infizierten Zellen (Abb. 5.4). Aufgrund des inhibitorischen Effekts der Substanzen wurde die Bildung der Nachkommen-Viren in Gegenwart der Substanzen strikt unterdrückt. Zwar zeigten die Aktivitäten der Substanzen Unterschiede, aber alle Substanzen hatten einen ähnlichen Effekt auf die Inhibition der Freisetzung von Virionen.

In der Bestimmung der Abhängigkeit der inhibitorischen Effekte von der Zeit der Zugabe konnte gezeigt werden, dass alle Substanzen (BDCRB,  $Cl_4RB$  und BDCRB) eine Plaquebildung bis zu dem Zeitpunkt 48 h p.i. strikt unterdrückten und zu späteren Zeitpunkten Unterschiede in Abhängigkeit von der jeweiligen Substanz zeigten. Dies verdeutlicht, dass diese Substanzen im Gegensatz zu GCV (Evers et al., 2004), das erst nach Beginn der viralen DNA-Replikation wirkt, vor der DNA-Verpackung wirksam sind.

Interessanterweise zeigten BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB einen ähnlichen Effekt bis zu dem Zeitpunkt 96 h p.i, wohingegen BDCRB eine geringfügige Differenz aufwies (Abb. 5.5). Daraus kann man schließen, dass die Substanzen zwar nach der *de novo* DNA-Synthese aber zu einem frühen Zeitpunkt der DNA-Verpackung wirken. Demgegenüber wurde die Wirksamkeit in Gegenwart von GCV und Maribavir zu einem sehr frühen Stadium des Replikationszyklus (bis 24 h p.i) nachgewiesen (Evers et al., 2004). Eine Erklärung hierfür könnte die differente Wirkungsweise sein. Maribavir inhibiert die Virusreifung, indem die Wirkung der viralen Proteinkinase pUL97 und pUL27 blockiert wird (Biron et al., 2002; Komazin et al., 2003).

Als nächstes wurde die Wirkung der Substanzen auf die interazelluläre Lokalisation und die Expression von verschiedenen Proteinen analysiert. Obwohl die Substanzen die Replikation beeinflussen, hatten die Substanzen keinen Effekt auf die intrazelluläre Lokalisation und auf die Expression von sehr frühen, frühen und späten Proteinen. Infolgedessen war weder die intrazelluläre Lokalisation des Proteins IE-1 noch die Expression der frühen Proteine pUL44, sowie pUL112-113, die sich in den Replikationszentren befinden (Giesen et al., 2000a), betroffen. Darüber hinaus wurde ebenfalls kein Effekt auf die Expression der späteren Proteine, das Hauptkapsidprotein MCP und das Tegumentprotein pp65, beobachtet.

Weiterhin wurde der Einfluss der Substanzen auf die pUL56 assoziierte DNA-Bindung durch *in vitro*-Translation des Proteins mit radioaktiv markierten [<sup>35</sup>S]-Methionin untersucht. Alle Substanzen konnten die Fähigkeit von pUL56 DNA zu binden nicht inhibieren. Offenbar wurde die Struktur von pUL56 nicht verändert, so dass die DNA-Bindungsfähigkeit in Gegenwart der Substanzen nicht verloren gegangen ist (Abb. 5.6). Darüber hinaus lässt sich dieses Ergebnis damit in Einklang bringen, dass alle Substanzen keinen Effekt auf das frühe Stadium der viralen DNA-Verpackung.

Nach der Bildung der konkatemeren DNA durch den 'rolling circle' Replikationsmechanismus muss die Bindung der HCMV Terminase pUL56 an DNA erfolgen, da sonst die Translokation zu den Prokapsiden und eine nachfolgende Spaltung nicht ablaufen würde. Mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese konnten wir zeigen, dass die neuen Benzimidazol Derivate

BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB einen inhibitorischen Effekt auf die Spaltung der konkatemeren DNA haben, da die Spaltung in Genomeinheiten bei behandelten infizierten Zellen nicht detektiert wurde (Abb. 5.7.1, Spur 3 und 5). Dies wurde für die Ursprungssubstanz BDCRB bereits gezeigt (Underwood et al., 1998). Ein weiterer Punkt war nachzuweisen, in welcher Konzentration die Inhibition der DNA-Spaltung optimal ist. Im Fall von BTCRB konnte gezeigt werden, dass die optimale Inhibition der Spaltung der konkatemeren DNA ab einer Konzentration von 100 nM BTCRB erfolgte. Je höher die eingesetzte Konzentration von BTCRB war, desto deutlicher wurde die Spaltung der konkatemeren DNA inhibiert (Abb. 5.7.2 Spur 6 – 8). Im Gegensatz dazu erfolgte bei BDCRB die Inhibition ab einer Konzentration von etwa 320 nM (Underwood et al., 2004). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Inhibition der DNA-Spaltung durch die neue Substanz BTCRB höher ist als für die Ursprungssubstanz BDCRB.

Mittels Elektronenmikroskopie von Ultradünnschichten konnte der Effekt der Substanzen auf die Bildung infektiöser Partikel nachgewiesen werden. Dabei wurden überwiegend B-Kapside im Zellkern von behandelten infizierten Zellen gebildet, wohingegen in unbehandelten infizierten Zellen sowohl A-, B-, und C-Kapside im Zellkern als auch reife Virionen im Cytoplasma detektiert werden konnten (Abb. 5.9.1). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass in Gegenwart der Substanzen die DNA-Verpackung gehemmt wird, so dass keine replikativen Strukturen im Kern ausgebildet werden können.

Es ist bereits bekannt, dass in Gegenwart von BDCRB die ATPase-Aktivität von pUL56 inhibiert wird (Savva et al., 2004; Hwang et al., 2007). Diese Inhibition der ATPase-Aktivität von pUL56 führt zur Blockade der Translokation viraler DNA in das Prokapsid, da für diesen Schritt Energie notwendig ist. Infolgedessen ist die DNA-Verpackung beeinflusst, so dass überwiegende B-Kapside gebildet werden. Darüber hinaus konnte in Gegenwart von BTCRB beobachtet werden, dass nicht nur die DNA-Verpackung blockiert ist, sondern auch die Freisetzung aus dem perinukleären Raum ins Zytoplasma. Diese kapsidlosen Prokapside wurden nicht durch die Kernmembran ins Zytoplasma freigesetzt, sondern verblieben im perinukleären Raum. Diese Blockade der Freisetzung aus dem Kern wurde bisher nur bei Maribavir beobachtet (Krosky et al., 2003). Krosky konnte zeigen, dass in Gegenwart von Maribavir die DNA-Verpackung stattfand aber die Freisetzung von C-Kapsiden blockiert war. Nach

Abschluss der Analysen ergibt sich die Frage nach den Mechanismen der Inhibitoren. Die Wirkungsweise dieser effektiven neuen Inhibitoren könnte über zwei verschiedene Angriffspunkte erfolgen. Zum Einem kann es sein, dass in Anwesenheit der Substanzen die Form der Proteine verändert wurde. Zum Anderem könnte es sich um eine sterische Inhibition handeln, die die Protein-Protein Interaktion unterbindet.

### **6.3 Wirkung neuer Benzimidazole D-Ribonukleoside auf klinische HCMV-Isolate**

Zunächst sollte die Wirkung der neuen Benzimidazole D-Ribonukleosid Derivate auf klinischen HCMV-Isolaten überprüft werden, die aus HCMV-positiven Patientenserien isoliert wurden. Um der Frage nachzugehen, ob die neuen Benzimidazol D-Ribonukleoside Derivate einen ähnlichen Effekt auf HCMV-Isolate wie auf den HCMV Laborstamm AD169 haben, wurden Analysen zur antiviralen Aktivität durchgeführt.

Mittels des antiviralen Aktivitäts-Tests konnte gezeigt werden, dass alle Substanzen sowohl gegen GCV-sensitive (K. Korn, Erlangen) als auch GCV-resistente HCMV-Isolate (K. Hamprecht, Tübingen) effektiv sind. Wie erwartet, war der  $IC_{50}$ -Wert der GCV-resistenten HCMV-Isolate höher als der der GCV-sensitiven HCMV-Isolate (Abb. 5.10; Tabelle 5.4). Interessanterweise zeigte Cl<sub>4</sub>RB eine hohe Effektivität bei einer Infektion mit GCV-resistenten HCMV-Isolaten mit einem  $IC_{50}$ -Wert von etwa 0,15  $\mu$ M (Tabelle 5.4), der 400-fach unter dem  $CC_{50}$ -Wert liegt. Im Vergleich dazu wies das Benzimidazol L-Ribonukleosid Maribavir einen  $IC_{50}$ -Wert von etwa 0,42  $\mu$ M gegen HCMV-Isolate auf (McSharry et al., 2001b). Eine ähnliche von der Bayer AG entwickelte Substanz, BAY38-4766, die ebenfalls auf die Terminase wirkt, wies einen  $IC_{50}$ -Wert von etwa 1  $\mu$ M bei einer Infektion mit HCMV-Isolaten auf (Reefenschläger et al., 1998; Mcsharry et al., 2001a). Zusammenfassend zeigen die Experimente, dass das Benzimidazol D-Ribonukleosid Cl<sub>4</sub>RB der wirksamste Inhibitor gegen HCMV-Isolate zu sein scheint.

Bei dem Effekt für die Freisetzung von Virionen erfolgte keinen deutlichen Unterschied zwischen GCV-sensitive und -resistente HCMV Isolaten (Abb. 5.11). Darüber hinaus lässt sich dieses Ergebnis damit in Einklang bringen,

dass alle Substanzen einen ähnlichen Effekt auf die Inhibition der Freisetzung von Virionen in mit klinischen HCMV Isolaten infizierten Zellen.

Darüber hinaus inhibierte das neue Benzimidazol Derivat BTCRB die Spaltung konkatemerer DNA von beiden HCMV-Isolaten (Abb. 5.12). Allerdings war der Effekt gegen das GCV-sensitive Isolat höher als gegenüber dem GCV-resistenten HCMV-Isolat. Dies könnte an der Auswirkung durch die GCV-Behandlung liegen oder daran, dass ein anderer Wirkmechanismus vorliegt.

In Anwesenheit der Substanzen wird sowohl die Verpackung von viraler DNA als auch die Bildung von infektiösen Partikeln unterbunden. Somit wurden statt der C-Kapside lediglich DNA-negative B-Kapside und nicht-infektiöse Partikel wie dense bodies gebildet (Abb. 5.13).

### **6.4 Wirkung neuer Benzimidazol D-Ribonukleoside auf anderen Herpesviren**

Ein weiterer Punkt für die Charakterisierung von antiviralen Substanzen ist die Analyse, ob eine Wirkung auf anderen Herpesviren vorhanden ist.

Interessanterweise zeigte BTCRB einen Effekt auf allen bis jetzt getesteten Herpesviren, wobei die Wirkung im Vergleich zu HCMV jedoch reduziert war. Cl<sub>4</sub>RB hatte einen vergleichbaren Effekt nur auf VZV und RCMV (Abb. 5.15), wohingegen BDCRB keine Wirkung auf anderen Herpesviren hat.

Ähnliche Untersuchung wurde mit dem Benzimidazol L-Ribonukleosid Maribavir durchgeführt. Maribavir hat keinen Effekt auf HSV-1, HSV-2, VZV und MCMV (Biron et al., 1996), zeigte jedoch einen inhibitorischen Effekt gegen EBV (Zacny et al., 1999). Hierbei war die Phosphorylierung des EBV DNA Polymerase Faktors EA-D betroffen (Gersburg et al., 2002). Der Inhibitor BAY 38-4766 wies eine Effektivität gegen GPCMV auf (Schleiss et al., 2005). Infolgedessen scheint die Effektivität dieser Substanzen auf andere Herpesviren einen lohnenden Ansatz für die Entwicklung der antiviralen Therapie zu sein. In Zukunft wäre es denkbar, dass durch chemische Veränderung der Substanzen das Wirkungsspektrum verbessert wird. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass die neuen Benzimidazol Derivate BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB gute Targets für die antivirale

Therapie darstellen, da sie sowohl gegen den HCMV Laborstamm AD169 als auch gegen die HCMV-Isolate effektiv sind. Aufgrund der Inhibition der viralen Replikation führen die Substanzen BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB sowie BDCRB zu einer Inhibition der HCMV-Reifung damit zu einem frühen Block im Infektionszyklus. Infolgedessen eignen sich beide Substanzen BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB als attraktive alternative Inhibitoren für die weitere Entwicklung einer antiviralen Therapie. In der Zukunft könnten klinische Studien als nächster Schritt die Anwendbarkeit klären.



## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die neuen Benzimidazol D-Ribonukleosid Derivate BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB analysiert und nachfolgend ihre antivirale Wirkung auf die HCMV DNA-Replikation untersucht. Darüber hinaus wurde die antivirale Aktivität der Substanzen mit Hilfe von Plaque Reduktions Test bestimmt. Die neuen Benzimidazol D-Ribonukleosid Derivate BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB zeigten sowohl gegen den HCMV Laborstamm AD169 als auch gegen klinische HCMV-Isolaten eine Wirkung. Die unterschiedlichen IC<sub>50</sub>-Werte können auf unterschiedliche Wirkungsweisen der Substanzen auf die virale DNA-Replikation zurückgeführt werden. Mit Hilfe von Zytotoxizitäts Tests konnte gezeigt werden, dass Cl<sub>4</sub>RB einen höheren CC<sub>50</sub>-Wert im Vergleich zu BTCRB hat. Allerdings war bei BTCRB dieser immerhin noch 50-fach über den IC<sub>50</sub>-Wert liegt. Anschließend wurden Analysen zur Stabilität der Substanzen *in vivo* durchgeführt. Interessanterweise wies das neue Benzimidazol D-Ribonukleoside Derivate BTCRB die höchste Stabilität in Zellkultur im Vergleich zur Ursprungssubstanz BDCRB, die aufgrund der geringen metabolischer Stabilität im Tiermodell als antivirales Medikamente nicht weiterentwickelt wurde, auf. Infolgedessen könnte die Stabilität der Substanzen vorteilhaft für einen zukünftigen Ansatz in der antiviralen Therapie sein. Außerdem sollte die Frage, ob die neuen Benzimidazol D-Ribonukleosid Derivate einen inhibitorischen Effekt auf HCMV DNA-Replikation haben, mit Hilfe verschiedener Methoden untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass die Substanzen einen inhibitorischen Effekt für die Freisetzung von Virionen im Vergleich zu unbehandelten Zellen haben. Weiterhin konnte mittels Bestimmung der Abhängigkeit der inhibitorischen Effekte von der Zeit der Zugabe gezeigt werden, dass die Substanzen effektiv zu einen frühen Zeitpunkt des Infektionszyklus (bis 96 h. p.i) wirken. Diese Wirkungsweise der Substanzen ist unterschiedlich im Vergleich zu anderen Inhibitoren wie beispielweise GCV sowie Maribavir, die im sehr frühen Stadium des Replikationszyklus (bis 24 h p.i) wirksam sind. Anschließend wurde mittels PFGE demonstriert, dass beide Substanzen BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB die Spaltung konkatemerer DNA in Monomere inhibieren und sehr effektiv sowohl gegen HCMV AD169 als auch gegen die klinische HCMV-Isolate sind.

Mittels Elektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten in den behandelten infizierten Zellen wurden überwiegend nicht-infektiöse Partikel nachgewiesen. Dabei handelte es sich hauptsächlich um B-Kapside und dense bodies, da die Inhibitoren die DNA-Verpackung blockieren und somit keine infektiösen Strukturen gebildet werden. Demgegenüber zeigten beide Substanzen BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB weder einen Effekt auf die pUL56-assoziierte DNA-Bindung noch auf die Expression anderer viraler Proteine. Weiterhin wurde die Wirksamkeit der Substanzen auf anderen Herpesviren getestet. Interessanterweise zeigen BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB sowohl einen Effekt gegen Varicella-Zoster-Virus (VZV) als auch Ratten-Cytomegalovirus (RCMV), wohingegen der Effekt gegen Herpes-simplex-Virus Typ-1 (HSV-1) und Maus-Cytomegalovirus (MCMV) gering war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Inhibitoren BTCRB und Cl<sub>4</sub>RB vorwiegend ein attraktives selektives Target für die DNA-Verpackung sind so dass sie einen lohnenden Ansatz für die antivirale Therapie darstellen.

## 8. Literaturverzeichnis

**Anders, D. G., Kacica, M.A., Pari, G. & Punturieri, S. M. (1992).** Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication. *J. Virol.* **66**, 3373-3384

**Andreoni, M., Faircloth, M., Vulger, L., Britt, W.J. (1989).** A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J. Virol. Methods* **23**, 157-167

**Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Chee, M. S., Hutchison, C. A., Kouzarides, T., Marignetti, J. A. & Preddie, E. (1991).** The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *DNA Seq.* **2**, 1-12

**Battista, M. C., Bergamini, G., Boccuni, M. C., Campanini, F., Ripalti, A. & Landini, M. P. (1999).** Expression and characterization of a novel structural protein of human cytomegalovirus, pUL25. *J. Virol.* **73**, 3800-3809

**Beavan, G.R., Holiday, E.R., Johnson, E.A., Elliis, B., Mamalis, P., Petrow, V., Sturgeon, B. (1949).** The chemistry of anti-pernicious anaemia factors Part III. 5:6-Disubstituted benzimidazoles as products of acid hydrolysis of vitamin B<sub>12</sub>. *J. Pharmacy Pharmacol.* 1949 **1**, 957-970

**Biron, K. K., Davis, M.G., Stanat, S.C., Waltin, L.M., Smith, A., Kozalka, G.W., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Harvey, R.J. (1996).** Antiviral activity and mechanism of action of 1263W94, a benzimidazole riboside inhibitor of human cytomegalovirus. *Abstr. H85*, p. 178 In Program and Abstracts of the 36<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

**Biron, K.K., Harvey, R.J., Chamberlain, S.C., Good, S.S., SmithIII, A.A., Davis, M.G., Talarico, C.L., Miller, W.H., Ferris, R., Dornsife, R.E., Stanat, S.C., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Kozalka, G.W. (2002).** Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-Riboside with a unique mode of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Aug. **2002**, 2365-2373

**Britt, W.J. & Auger, D. (1985).** Identification of a 65000 dalton virion envelope protein of human cytomegalovirus. *Virus Res.* **4**, 31-36

**Bogner, E., Reschke, M., Reis, B., Reis, E., Britt, W. & Radsak, K. (1992).** Recognition of compartmentalized intracellular analogs of glycoprotein H of human cytomegalovirus. *Arch. Virol.* **126**, 67-80

**Bogner, E., Radsak, K. & Stinski, M. F. (1998).** The gene product of human cytomegalovirus open reading frame UL56 binds the pac motif and has specific nuclease activity. *J. Virol.* **72**, 2256-2264.

**Bogner, E. (1999).** Human cytomegalovirus (HCMV) nuclease: implication for new strategies in gene therapy. *Gene Ther. Mol. Biol.* **3**, 75-78

- Bogner, E. (2002).** Human cytomegalovirus terminase as a target for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol.* **12**, 115-127, Review
- Bold, S., Ohlin, M., Garten, W. & Radsak, K. (1996).** Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) mediated cell-cell fusion. *J. Gen. Virol.* **77**, 2297-2302.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B. & Schaffner, W. (1985).** A Very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* **41**, 521-530.
- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., Moore, P.S. (2004).** Identification of herpesvirus-like DNA sequence in AIDS-associated Kaposi's Sarcoma. *Science* **266**, 1865-1869
- Chee, M. S., Bankier, A. T., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchinson III, C. A., Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E., Sathwell, S. C., Tomlinson, P., Weston, K. M. & Borell, B. G. (1990).** Analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top-Microbio. Immunol.* **154**, 125-169
- Cheung, T. W. & Teich, S. A. (1999).** Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *Mt Sinai J Med.* **66**, 113-124
- Chulay, J., Biron, K., Wang, L., Underwood, M., Chamberlain, S., Frick, L., Good, S., Davis, M., Harvey, R., Townsend, L., Drach, J.C. und Koszalka, G. (1999).** Development of novel benzimidazole riboside compounds for treatment of cytomegalovirus disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **458**, 129-134
- Compton, T., Nepomuceno, R. R. & Nowlin, D. M. (1992).** Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* **191**, 687-395
- Compton, T., Nowlin, D. M. & Cooper, N. R. (1993).** Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-841
- Compton, T. (1995).** Towards a definition of the HCMV entry pathway. *Scandinavian J. Inf. Des.* **99**, 30-31
- Curran, M. and Noble, S. (2001).** Valganciclovir. *Drugs* **61**, 1145-1150
- DeClercq, E. (1993).** Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **32(A)**, 121
- Deray, G.F., Martinez, F., Katlama, C., Levatier, B., Beaufils, H., Danis, M., Rosenheim, M., Baumelou, M., Dohin, M., Gentilini, M., Jocabos, C. (1989).** Foscarnet nephrotoxicity : mechanism, incidence and prevention. *J. Nephrol.* **9**, 316-320
- Diefenbach RJ, Miranda-Saksena, M., Diefenbach, E. Holland, D.J., Boadle, R.A., Armati, P.J., Cunningham, A.L. (2002).** Herpes simplex virus tegument protein US11 interacts with conventional kinesin heavy chain. *J. Virol.* **76**, 3282-3291

**Dohner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujarin, D., Vallee, R., Sodeik, B. (2002).** Function of Dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2795-2809

**Drach, J.C., Townsend, L.W. and Bogner, E. (2006).** Benzimidazole D-ribonucleoside as antiviral agents that target HCMV terminase. *in: Bogner E. and Holzenburg A. (eds.): New Concepts of Antiviral Therapy; Springer, Dordrecht*:337-349

**Dutch, R. E., Bruckner, R. C., Mocarski, E. S. & Lehman, I. R. (1992).** Herpes simplex virus type1 recombination: Role of DNA replication and viral sequences. *J. Virol.* **47**, 421-433

**Erice, A. (1999).** Resistance of human cytomegalovirus of antiviral drugs. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 286-297

**Evers, E.L., Komazin, G., Ptak, R.G., Shin, D., Emmer, B.T., Townsend, L.B. and Drach, J.C. (2004).** Inhibition of human cytomegalovirus replication by benzimidazole nucleosides involves three distinct mechanisms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **Oct. 2004**, 3918-3927

**Frenkel, N., Schirmer, E.C., Wyatt, L.S., Katsafanas, G., Roffman, E., Davovich, R.M., June, C.H. (1990).** Isolation of a new herpesvirus from human CD4+T cells. *Proc Natl. Acad Sci. USA* **87**, 748-752

**Gershburg, E. and Pagno, J. S. (2002).** Phosphorylation of the Epstein-Barr virus DNA polymerase processivity factor EA-D by the EBV-encoded protein kinase and effects of the L-riboside benzimidazole 1263W94. *J. Virol.* **Feb. 2002**, 998-1003

**Gibson, W. (1983).** Protein counterparts of human and simian cytomegaloviruses. *Virology* **128**, 391-406

**Gibson, W., Baxter, M. K. & Clopper, K. S. (1996a).** Cytomegalovirus "missing" capsid protein identified as heat-aggregable product of human cytomegalovirus UL46. *J. Virol.* **70**, 7454-7461

**Gibson, W., Clopper, K. S., Britt, W. J. & Baxter, M. K. (1996b).** Human cytomegalovirus (HCMV) smallest capsid protein identified as product of small open reading frame located between HCMV UL48 and UL49. *J. Virol.* **70**, 5680-5683

**Gibson, W. (1996c).** Structure and assembly of the virion. *Intervirology* **39**, 389-400

**Giesen, K., Radsak, K., Bogner, E. (2000a).** Targeting of the gene product encoded by ORF UL56 of human cytomegalovirus into viral replication centers. *FEBS Letters* **471**, 215-218

**Giesen, K., Radsak, K., Bogner, E. (2002b).** The potential terminase subunit of human cytomegalovirus, pUL56, is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts with importin  $\alpha$ . *J. Gen. Virol.* **81**, 2231-2244

**Good, S.S., Owens B.S., Townsend, L.B. and Drach, J.C. (1994).** The disposition in rats and monkeys of 2-bromo-5,6-dichloro-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-benzimidazole (BDCRB) and its 2,5,6-trichloro congener (TCRB). *Antivir. Res.* **23**, 103

**Griffiths, P. D. (1992).** Studies to define viral cofactors for human immunodeficiency virus. *Infectious Agents and Disease* **1**, 237-244

**Griffiths, P. D. (1999).** Studies of viral co-factors for human immunodeficiency virus *in vitro* and *in vivo*. *J. Gen Virol.* **79**, 213-220

**Grundy, J. E., McKeating, J. A., Ward, P. J., Sanderson, A. R. & Griffiths, P. D. (1987).**  $\beta$ 2-microglobulin enhances the infectivity of cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecules to be fused as virus receptor. *J. Gen. Virol.* **68**, 793-803

**Haguenau, F. & Michelson, F. S. (1975).** Cytomegalovirus: nucleocapsid assembly and core structure. *Intervirology* **5**, 293-299.

**Hamprecht, K. & Jahn, G. (1994).** Zytomegalievirus Klinik und Therapie. *In Therapeutische Umschau, Viruserkrankungen in der Praxis.* Band **51**, Heft 8. Verlag Hans Huber, Bern, Schweiz.

**Hamprecht, K., Witzel, S., Machmann, J., Speer, C.P. & Jahn, G. (2000).** Transmission of cytomegalovirus infection through breast milk in term and preterm infants. The role of cell free milk whey and milk cells. *Advances in experimental medicine and biology* **478**, 231-239

**Hwang, J.-S. & Bogner, E. (2002).** ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J. Biol.Chem.* **277**, 6943-6948

**Hwang, J.-S., Kregler, O., Schilf, R., Drach J.C., Bannert, N., Townsend, L.W. and Bogner, E. (2007).** Identification of actylated, tetrahydrogenated benzimidazole D-ribonucleosides with enhanced activity against human cytomegalovirus. *J.Virol.* **Nov. 2007**, 11604-11611

**Irmieri, S., & Gibson, W. (1983).** Isolation and characterization of a non-infectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*, **130** 118-133

**Josephs, S.F., Salahddin, S.Z., Ablashi, D.V., Schachter, F., Wong-Staal, F., Gallo, R.C. (1986).** Genomic analysis of the human B-lymphotropic virus (HBLV). *Science* **234**,601-603

**Keay, S., Merigan, T. C. & Rasmussen, L. (1989).** Identification of cell surface receptors for the 86-kilodalton glycoprotein of Human Cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 10100-10103

**Keay, S. & Baldwin, B. (1992).** The human fibroblast receptor for gp86 of human cytomegalovirus is a phosphorylated glycoprotein. *J. Virol.* **66**, 4834-4838

**Kemble, G. W. & Mocarski, E. S. (1989).** A host cell protein binds to a highly conserved sequence element (pac-2) within the cytomegalovirus sequence. *J. Virol.* **63**, 4715-4728

**Komazin, G., Ptak, R. G., Emmer, T., Townsend, L.W. and Drach, J.C. (2003).** Resistance of human cytomegalovirus the benzimidazole L-ribonucleoside maribavir maps to UL27. *J. Virol.* **72**, 11499-11506

**Koszalka R., Chamberlain, S.D., Harvey, R.J., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Biron, K.K. (1996).** Benzimidazoles for the treatment of human cytomegalovirus. Presented at the Ninth International Conference on Antiviral Research, 19-24 May 1996, Fukushima, Japan

**Krosky, P.M., Underwood, M.R., Turk, S.R., Feng, W.-H., Jain, R.K., Ptak, R.G., Westerman, A.C., Biron, K.K., Townsend, L.W. and Drach, J.C. (1998).** Resistance of human cytomegalovirus to benimidazole ribonucleosides maps to two open reading frames: UL89 and UL56. *J. Virol.* **72**, 4721-4728

**Krosky, P.M., Borysko, K., Nassiri, M.R., Devivar, R.V., Ptak, R.G., David, M.G., Biron, K.K., Townsend, L.B., Drach, J.C. (2002).** Phosphorylation of  $\beta$ -D-ribosylbenzimidazoles is not required for activity against human cytomegalovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 478-486

**Krosky, P.M., Baeck, C. and Coen, D.M. (2003).** The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *J. Virol.* **77**, 905-914

**Ladin, B. F., Blankenship, M. L. & Ben-Porat, T. (1980).** Replication of herpesvirus DNA. V. The maturation of concatemeric DNA of pseudorabies virus to genome length is related to capsid formation. *J. Virol.* **33**, 1151-1164

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

**LaFemina, R. L. & Hayward, F. S. (1983).** Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive BALB/c-3T3 mouse cells. *J. Gen. Virol.* **64**, 373-389

**Landini, M. P., Severi, B., Furlini, G. & Badiali, De Giorgi L. (1987).** Human cytomegalovirus structural components: intracellular and intraviral localization of p28 and p65-69 by immunoelectron microscopy. *Virus Res.* **8**, 15-23

**Landini, M. P. & Michelson, S. (1988).** Human cytomegalovirus proteins. *Prog. Med. Virol.* **35**, 152-185

**Lurain, N. S., Thomson, K. D., Holmes, E. W. & Read, G. S. (1992).** Point mutations in the DNA polymerase gene of human cytomegalovirus that result in resistance to antiviral agents. *J. Virol.* **66**, 7146-7152

**Lurain, N. S., Spafford, L. E. & Thomson. K. D. (1994).** Mutation in the UL97 open reading frame of human cytomegalovirus strains resistant to ganciclovir. *J. Virol.* **68**, 4427-4431

**McGavran, M. H. & Smith, M. G. (1965).** Ultrastructural, cytochemical and microchemical observations on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. *Exp. Mol. Pathol.* **4**, 1-10

**Mcsharry, J.J., McDonough, A., Betty, O., Hallenberger, S., Reefschlaeger, J., Bender, W., Drusano, G.L. (2001a).** Susceptibilities of human cytomegalovirus clinical

Isolates to BAY38-4766, BAY43-9695 and Ganciclovir *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **Oct.** 2925-2927

**Mcsharry, J.J., McDonough, A., Betty, O., Talarico, C., Davis, M., Biron, K.K. (2001b).** Inhibition of ganciclovir-susceptible and -resistant human cytomegalovirus clinical isolates by the benzimidazole L-riboside 1263W94 *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **Nov.** 1279-1282

**McVoy, M. A. & Adler, S. P. (1994).** Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* **68**, 1040-1051

**McVoy, M. A., Nixon, D. E., Adler, S. P. & Mocarski, E. S. (1998).** Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J. Virol.* **72**, 48-56

**Meyer, G. A. & Radsak, K. D. (2000).** Identification of a novel signal sequence that targets transmembrane proteins to the nuclear envelope inner membrane. *J. Biol. Chem.* **275**, 3857-3866

**Michel, D., Schaarschmidt, P., Wunderlich, K., Heuschmid, M., Simoncini, L., Mühlberger, D., Zimmermann, A., Pavić, I. & Mertens, T. (1998).** Functional regions of the human cytomegalovirus protein pUL97 involved in nuclear localization and phosphorylation of ganciclovir and pUL97 itself. *J. Gen. Virol.* **79**, 2105-2112

**Mocarski, E. S., Liu, A. C. & Spaete, R.R. (1987).** Structure and variability of the a sequence in the genome of human cytomegalovirus (Towne strain). *J. Gen. Virol.* **68**, 2223-2230

**Murphy, E. & Shenk, T. (2008).** Human cytomegalovirus genome. *Curr Top Microbiol Immunol.* **325**, 1-19

**Navarro, D., Pat, P., Tugizov, S., Torp, K., LaVail, J. & Pereira, L. (1993).** Glycoprotein gB of Human Cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* **197**, 143-158

**Newcomb, W. W., Homa, F. L., Booy, F. P., Thomsen, D. R., Trus, B. L. Steven, A. C., Spencer, J. V. & Brown, J. C. (1996).** Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *J. Mol. Biol.* **263**, 432-446

**Nixon, D.E. and McVoy, M.A. (2004).** Dramatic effects of 2-bromo-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosyl benzimidazole on the genome structure, packaging, and egress of guinea pig cytomegalovirus. *J. Virol.* **78**, 1623-1635

**North, T.W., Sequer, G., Townsend, L.B., Drach, J.C., Barry, P.A. (2004).** Rhesus cytomegalovirus is similar to human cytomegalovirus in susceptibility to benzimidazole nucleosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2760-2765

**Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U., Helenius, A. (2000).** Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex *in vitro*. *Mol Cell Biol.* **20**, 4922-4931



**Pass, R.F. (2001).** Cytomegalovirus. In Knipe. *Fields Virology 4. Edition*, New York Raven Press. 2675-2705

**Perdue, M. L., Cohen, J. C., Randall, C. C. & O'Callaghan, D. J. (1976).** Biochemical studies of the maturation of herpes virus nucleocapsid species. *Virology* **74**, 197-208

**Pietropaolo, R. & Compton, T. (1999).** Interference with annexin II has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells. *J. Gen. Virol.* **80**, 1807-1816

**Radsak, K., Schneider, D., Jost, E. & Brücher, K. H. (1989).** Alteration of nuclear lamina protein in human fibroblasts infected with cytomegalovirus (HCMV). *Arch. Virol.* **105**, 103-112

**Radsak, K., Brücher, K. H., Britt, W., Shiou, H., Schneider, D. & Kollert, A. (1990).** Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* **177**, 515-522

**Rasak, K., Eichmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hübinger, A. & Reschke, M. (1996).** Retrieval of human cytomegalovirus from infected cell surface for viral envelopment. *Arch. Virol.* **120**, 557-572

**Reefschlaeger, J., Bender, W., Hallenberger, S., Weber, O., Eckenberg, P., Goldmann, S., Haerter, M., Buerger, I., Trappe, J., Herrington, J.A., Haebich, D., Ruebsamen-Waigmann, H. (2001).** Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY38-4766): *in vitro* and *in vivo* antiviral activity and mechanism of action *J. of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 757-767

**Reschke, M., Reis, B., Nöding, K., Rohsiepe, D., Richter, A., Mockenhaupt, T., Garten, W. & Radsak, K. (1995).** Constitutive expression of Human Cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains. *J. Gen. Virol.* **76**, 113-122

**Rixon, F. J., Cross, A. M., Addison, C. & Preston, V. G. (1988).** The products of herpes simplex virus type 1 gene UL26 which are involved in DNA packaging are strongly associated with empty but not with full capsids. *J. Gen. Virol.* **69**, 2879-2891

**Rixon, F. J. (1993).** Structure and assembly of herpesviruses. *Semin. Virol.* **4**, 135-144

**Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., De-The, G. Nahmias, A. R., Plowright, W., Rapp, R., Sheldrick, P., Takahashi, M. & Wolf, K. (1981).** Herpesviridae definition, provisional nomenclature and taxonomy. *Intervirology* **16**, 201-217

**Roizman, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A. C. & Suddert, M. J. (1992).** The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* **123**, 425-449

**Roizman, B. (1993).** The family herpesviridae: a brief introduction. In *The human herpesviruses*, pp. 1-9. Edited by B. Roizman, R. J. Whitley & C. Lopez. Raven Press, New York.

**Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C., Heubner, R.J. (1956).** Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 418-424

**Sanchez, V., Angeletti, P. C., Engler, J. A. & Britt, W. J. (1998).** Localization of human cytomegalovirus structural proteins to the nuclear matrix of infected human fibroblasts. *J. Virol.* **72**, 3321-3329

**Sanchez, V., Greis, K. D., Sztul, E. & Britt, W. J. (2000).** Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J. Virol.* **74**, 975-986

**Sarov, I., & Abady, I. (1975).** The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirus and dense bodies. *Virology* **66**, 464-473

**Savva, C.G.W., Holzenburg, A. und Bogner, E. (2004).** Insights into the structure of human cytomegalovirus large terminase subunit pUL56. *FEBS Letters* **563**, 135-140

**Scheffczik, H., Savva, C. G. W., Holzenburg, A., Kolesnikova, L., & Bogner, E., (2002).** The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA-metabolizing proteins with toroidal structure. *Nucleic Acids Research.* **30**, 1695-1703

**Schleiss, M.S. & Heineman, T.C. (2005).** Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines* **4**, 381-406

**Schleiss, M.S., Bernstien, D.I., McVoy, M.A., Stroup, G., Bravo, F., Creasy, B., McGregor, A., Henninger, K., Hallenberger, S. (2005).** The non-nucleoside antiviral, BAY38-4766, protects against cytomegalovirus (CMV) disease and mortality in immunocompromised guinea pigs *Antiviral Research* **65**, 35-43

**Schneeweis, K.E. (1962).** Serologiesche Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus Hominis. *Z Immunitätsforsch Exp Ther.* **124**, 24-48

**Scholz, B., Rechter, S., Drach, J. C., Townsend, L. B., Bogner, E. (2003).** Identification of the ATP-binding site in the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Nucleic Acids Research*, Vol.**31**, No.**5**, 1426-1433

**Smith, M.G. (1956).** Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human Salivary Gland Virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol.* **92**, 424-430.

**Sodeik, B., Ebersold, M. W. & Helenius. A. (1997).** Mikrotubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* **136**, 1007-1021

**Söderberg, C, Giugni, T. D., Zaia, J. A., Larson, S., Wahlberg, J. M. & Möller, E. (1993).** CD13 (human aminopeptidase-N) mediates Human Cytomegalovirus infection. *J. Virol.* **67**, 6576-6585

**Stinski, M. F., Thomson, D. R. & Wathen, M. N. (1981).** Structure and function of the cytomegalovirus genome. In *The Human Herpesviruses*. Edited by S. J. Nahamias, W. R. Dowle, & R. F. Schinazi. An interdisciplinary perspective, Elsevier, New York.

- Stinski, M. F., Thomson, D. R., Stenberg, R. M. & Goldstein, L. C. (1983).** Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **64**, 2484-2490
- Sullivan, V., Talarico, C.L., Stanat, S.C., Davis, M., Coin, D.M. & Biron, K. K. (1992).** A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* **358**, 162-164
- Tamm, I., Folkers, K., Shunk, C.H., Horsfall, F.L. (1954).** Inhibition of influenza virus multiplication by n-glycosides of benzimidazoles. *J. Exp. Med.* **99**, 227-250
- Thoma, C., Borst, E., Messerle, M., Rieger, M., Hwang, J.-S. and Bogner, E. (2006).** Identification of the interaction domain of the small terminase subunit pUL89 with the large subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Biochemistry* **2006**, **45**, 8855-8866
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radask, K. & Kern, H. (1993).** Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur. J. Cell Biol.* **60**, 163-178
- Toupance, o., Bouedjoro-camus, M.C., Carquin, J., Novella, J.L., Lavaud, S., Wynckel, A., Jolly, D. & Chanard, J. (2000).** Cytomegalovirus-related disease and risk of acute rejection in renal transplant recipients: a cohort study with case-control analyses. *Transpl. Int.* **13(6)**, 413-419
- Townsend, L.B. and Revankar, G.R. (1970).** Benzimidazole nucleosides, nucleotides, and related derivatives. *Chem. Rev.* **70**, 389-438
- Townsend, L.B., Devivar, R.V., Turk, S.R., Nassiri, M.R., Drach, J.C. (1995).** Design, synthesis and antiviral activity of certain 2,5,6-trihalo-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) benzimidazoles. *J. Med. Chem.* **38**, 4098-4105
- Trus, B. L., Gibson, W., Cheng, N. & Steven, A. C. (1999).** Capsid structure of simian cytomegalovirus from cryoelectron microscopy: evidence for tegument attachment sites. *J. Virol.* **73**, 2181-2192
- Underwood, M. R., Harvey, R. J., Stanat, S. C., Hemphill, M. L., Miller, T., Drach, J. C., Townsend, L. B. & Biron, K. K. (1998).** Inhibition of human cytomegalovirus DNA maturation by a benzimidazole ribonucleoside is mediated through the UL89 gene product. *J. Virol.* **72**, 717-725
- Underwood, M.R., Ferris, R.G., Selleseth, D.W., Davis, M.G., Drach, J.C., Townsend, L.B., Biron, K.K. and Boyd, F.L. (2004).** Mechanism of action of the Ribopyranoside Benzimidazole GW275175X against human cytomegalovirus. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **May 2004**, 1647-1651
- Wathen, M.W. & Stinski, M.F. (1982).** Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate-early, early and late times after infection. *J. Virol.* **41**, 462-477
- Wright, H. T. Jr., Goodheart, C.R. & Lielausis, A. (1964).** Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining. *Virology* **23**, 419-424

**Yamamoto, T, Suzuki, S., Radsak K. & Hirai, K. (1998).** The UL112/113 gene products of human cytomegalovirus which colocalize with viral DNA in infected cell nuclei are related to efficient viral DNA replication. *Virus Res.* **56**, 107-114

**Yu, X., Trang, P., Shah, S., Antanasov, I., K, Y.H., Bai, Y., Zhou, Z.H., Liu, F. (2005).** Dissecting human cytomegalovirus gene function and capsid maturation by ribozyme targeting and electron cryomicroscopy. *PNAS May 17* **102(20)**, 7103-8

**Zacny, V.L., Gershburg, E., David, M.G., Biron, K.K. and Pagano, J.S. (1999).** Inhibition of Epstein-Barr virus replication by a benzimidazole L-riboside: Novel antiviral mechanism of 5,6-dichloro-2-(Isopropylamino)-1- $\beta$ -L-ribofuranosyl-1H-benzimidazole. *J. Virol.* **Sept. 1999**, 7271-7277

## 9. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
<i>aqua bidest</i>	destilliertes Wasser
Bamid	künstliches Bakterienchromosom
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovin serum albumin</i> )
Ci	Curie $\equiv 2,22 \times 10^{12}$ radioaktive Zerfälle/Minute
GCV	Ganciclovir
DAPI	4,2-Diamino-2-phenylindiol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos minimales, essentielles Medium
DMP-30	2,4,6-tris (dimethylaminomethyl)phenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	Doppelstrang, doppelsträngig
EM	Elektronenmikroskopie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCMV	<i>Guinea pig cytomegalovirus</i>
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HFF	Humane Vorhautfibroblasten
h.p.i.	Stunden nach Infektion
HSV-1	Herpes-simplex-Virus Typ-1
IE1	<i>Immedialte Early-Protein 1</i>
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
MCP	<i>major capsid protein</i>

MCMV	Maus-Cytomegalovirus
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mock	nicht infiziert
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pp	Phosphoprotein
RCMV	Ratten-Cytomegalovirus
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrum-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylaminomethan
TR	<i>terminal repeat</i>
üN	über Nacht
UL/US	<i>unique long/unique short</i>
v/v	Volumen/Volumen
VZV	Varicella-Zoster-Virus
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp

## Veröffentlichungen

### Publikationen

**Hwang, J.-S., Kregler, O., Schilf, R., Bannert, N., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Bogner, E.** (2007) Identification of acetylated, tetrahalogenated benzimidazole D-ribonucleosides with enhanced activity against human cytomegalovirus. *J. Virol.* **81**, 11604-11611

**Hwang, J.-S. and Bogner, E.** (2002) ATPase activity of the terminase subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* **277**, 6943-6948

**Thoma, C., Borst, E., Messerle, M., Rieger, M., Hwang, J.-S. and Bogner, E.** (2006) Identification of the interaction domain of the small terminase subunit pUL89 with the large subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Biochemistry* **45**, 8855-8863

### Posterpräsentationen und Vorträge

**Hwang, J.-S., Kregler, O., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Bogner, E.** A new benzimidazole D-ribonucleosides prevents ATPase activity of HCMV terminase subunit pUL56 and nuclear egress. 17<sup>th</sup> Annual Meeting Gesellschaft für Virologie, *München*, März 2006, Posterpräsentation

**Hwang, J.-S., Kregler, O., Schilf, R., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Bogner, E.** A new benzimidazole D-ribonucleosides prevents ATPase activity of HCMV terminase subunit pUL56 and nuclear egress. 1<sup>st</sup> Mini-Herpes Virus Workshop, *Berlin*, September 2006, Vortrag

**Hwang, J.-S., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Bogner, E.** Analysis of new benzimidazole D-ribonucleosides. 11<sup>th</sup> international CMV & Betaherpes Virus Workshop, *Toulouse*, Mai 2007, Vortrag und Posterpräsentation

**Hwang, J.-S., Kregler, O., Schilf, R., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Bogner, E.** New benzimidazole D-ribonucleosides inhibit viral DNA replication. Third European Congress of Virology, *Nürnberg*, September 2007, Posterpräsentation

---

**Hwang, J.-S., Kregler, O., Schlif, R., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Bogner, E.** New benzimidazole D-ribonucleosides inhibit viral DNA replication. 18<sup>th</sup> Annual Meeting Gesellschaft für Virologie, *Heidelberg*, März 2008, Posterpräsentation

**Hwang, J.-S., Schlif, R., Drach, J.C., Townsend, L.B. and Bogner, E.** Susceptibilities of HCMV clinical isolates and other herpesviruses to new acetylated, tetrahalogenated benzimidazole D-ribonucleosides. The 33rd international Herpesvirus Workshop, *Estoril*, August 2008, Posterpräsentation

Berlin, den .....

.....

Jae-Seon Hwang



## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den .....

.....

Jae-Seon Hwang

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Detlev H. Krüger danke ich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit am Institut für Medizinische Virologie an der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchzuführen, für die Betreuung der Arbeit am Fachbereich Biologie.

Herrn PD. Dr. Thorsten Wolff danke ich für die Begutachtung der Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppenleiterin PD.Dr. Elke Bogner für die überaus engagierte fachliche Betreuung und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen.

Den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, Alexandra Dittmer, Oliver Kregler, Corina Thoma, Marion Kaspari, Christina Meissner, Rita Schlif, Kathrin Dezer, Veronika Lausch und Angelika Lander, danke ich für die gute Zusammenarbeit. Vor allem danke ich Rita Schlif für die Einbettung der EM-Probe.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Virologie an der Charité-Universitätsmedizin Berlin danke ich für deren Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Im Besonderen möchte ich Min-Hi Lee danken, die mir in der Endphase meiner Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ganz besonders herzlich danke ich Eun-Young, Hachin und meinen Eltern, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht und mich immer in meinen Vorhaben unterstützt haben.

Schließlich danke ich herzlich auch meinem Gott, der mich immer bei allem unterstützt.